

Untersuchung der Verhaltensleistung
von Ratten mit Hilfe der instrumentellen
Konditionierung nach Intoxikation
mit umweltrelevanten Dosen
von Quecksilber

Josef Schormüller



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Biologie, Abt. für Strahlenbiologie
(Leiter: Prof. Dr. Dr. U. Hagen)
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF)
München, Neuherberg

vorgelegt über: Prof. Dr. K. Tempel
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

Untersuchung der Verhaltensleistung von Ratten mit Hilfe
der instrumentellen Konditionierung nach Intoxikation mit
umweltrelevanten Dosen von Quecksilber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Josef Schormüller
aus Nördlingen

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. K. Tempel

Korreferent: Prof. Dr. M. Ruf

Tag der Promotion: 28. Februar 1986

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Problemstellung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Vergiftungsfälle mit Quecksilberverbindungen	3
2.2 Umweltbelastung durch Quecksilberverbindungen	5
2.3 Wirkungsmechanismen	9
2.4 Höchstmengenfestlegung	11
2.5 Tierexperimentelle Untersuchungen	12
2.6 Verhaltenstestung	15
3. Material und Methoden	17
3.1 Versuchstiere	17
3.2 Haltung	17
3.3 Behandlung	19
3.4 Versuchsgruppen	20
3.5 Versuchsanlage	21
5.1 Tierwaage	21
5.2 Versuchsräume	21
5.3 Testboxen	21
5.4 Steuerungsanlage	25
3.6 Verhaltenstestung	27
6.1 Programmgrundlagen	27
6.2 Testprogramme	28
6.3 Zeitplan	31
6.4 Hell- Dunkel- Diskriminierung	33
3.7 Auswertung	34
7.1 Statistische Auswertung	34
3.8 Stoffwechselversuche und Restmengen- bestimmungen	37
3.9 Histologische Untersuchungen	38

4. Ergebnisse	40
4.1 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere während der Behandlung	40
4.2 Bestärkungsschema: "Differential Reinforcement of High Rate" (DRH)-Tests	42
2.1 Berechnung der DRH- Lernleistung	42
2.2 DRH 2/1- Lernleistung und Gewichtsveränderung	43
2.3 DRH 4/2- Lernleistung und Gewichtsveränderung	48
4.3 Bestärkungsschema: "Differential Reinforcement of Low Rate" (DRL)-Test	52
3.1 Berechnung der DRL- Lernleistung	52
3.2 DRL 1/8- Lernleistung und Gewichtsveränderung	52
4.4 Gesamtdarstellung der Lernleistungen während der verschiedenen Testprogramme	56
4.5 Hell- Dunkel- Diskriminierung	58
4.6 Aktivitätsverlauf und circadianer Rhythmus	62
4.7 Gewichtsentwicklung während der gesamten Versuchsdauer	66
4.8 Stoffwechselversuche und Restmengenbestimmungen	68
8.1 Stoffwechselversuche	68
8.2 Restmengenbestimmungen	69
4.9 Histologische Untersuchungen	71
9.1 Rasterelektronenmikroskopie	71
9.2 Lichtmikroskopie	72
4.10 Statistische Auswertung	73
5. Diskussion	75
6. Zusammenfassung	86
Summary	88
7. Literaturverzeichnis	90
Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen	97
Danksagung	98
Lebenslauf	99

1. Problemstellung

Die Gesundheit des Menschen und seine Umwelt sind durch eine Vielzahl von Stoffen in zunehmendem Maße gefährdet. Insbesondere Schwermetalle, die in vielen Industriezweigen verwendet werden und sich in der Biosphäre anreichern können, stellen eine potentielle, chronische Vergiftungsquelle für den Menschen und seine Umwelt dar. Da viele Schwermetallverbindungen, wie die des Quecksilbers zum Beispiel, praktisch ubiquitär, aber meist nur in geringen Konzentrationen auftreten, sind akute Vergiftungsfälle äußerst selten. Um aber die Auswirkungen chronischer Expositionen erfassen zu können und damit eine Risikoermittlung oder -abschätzung für eine Gefährdung des Menschen zu ermöglichen, erlangte in der umwelttoxikologischen Forschung die Suche nach geeigneten, standardisierten, reproduzierbaren und sensiblen Nachweismethoden eine besondere Bedeutung. In diesem Zusammenhang verfolgen verhaltenstoxikologische Untersuchungen den Zweck, Quecksilberdosen nachzuweisen, bei denen mit den üblichen klinischen, morphologischen oder histologischen Untersuchungsmethoden noch keine sicheren Schadwirkungen aufgedeckt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Methoden zur Testung des instrumentellen Lernverhaltens versucht, die Schadwirkungen von Methylquecksilberchlorid in drei Dosisbereichen auf das zentrale Nervensystem 4 Monate alter männlicher Wistar-Ratten nachzuweisen.

Einige Verhaltensuntersuchungen und hierbei besonders die detaillierten Untersuchungen des Lernverhaltens von Labornagern scheinen zum Nachweis von Funktionsstörungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) besonders geeignet. In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich auch bei erwachsenen ausgereiften und somit sicherlich unempfindlicheren Tieren ebenfalls eine Beeinträchtigung des Lernverhaltens

finden ließe, die in Analogie zu publizierten Befunden über ein defizitäres Lernverhalten bei pränatal mit Quecksilber belasteten Ratten stünden.

2. Literaturübersicht

Aktuelle Anlässe, sich mit den Auswirkungen und Gefahren von Umweltchemikalien experimentell zu befassen, waren stets akute Vergiftungsfälle, die den Menschen betrafen. Weltweites Aufsehen erregten während der letzten Jahrzehnte Vergiftungskatastrophen in Japan, im Irak und in Indien. Solche Ereignisse führen i. d. R. bei Gesundheitsüberwachungs- und Umweltschutzbehörden dazu, die Zulassungs- und Höchstmengenverordnungen neu zu überdenken, um einer drohenden Gefährdung der menschlichen Gesundheit zuvorkommen zu können. Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, müssen Vorkommen, Verbreitung, Wirkungsweisen, ökologische Kreisläufe sowie evtl. Anreicherungskreisläufe einmal als toxisch erkannter Umweltstoffe systematisch erfaßt und möglichst genau aufgeklärt werden.

2.1 Vergiftungsfälle mit Quecksilberverbindungen

In Japan kam es 1953 zu schweren, akut auftretenden Intoxikationen durch organische Quecksilberverbindungen. Damals litten im Bereich der Bucht von Minamata Hunderte von Menschen unter den Symptomen einer Nervenkrankheit. In mehreren Fällen führten diese Erkrankungen zum Tod der Betroffenen. Über hundert Personen, vor allem aber Fischer, waren schwer erkrankt, 46 von ihnen starben. Als Ursache dieser Katastrophe wurde methylquecksilberhaltiger Fisch identifiziert. Das Quecksilber stammte aus den Abwässern einer chemischen Fabrik, die bei der PVC - Herstellung metallisches Quecksilber als Katalysator eingesetzt hatte. Über die ungenügend gereinigten Abwässer gelangte dieses Quecksilber in die Bucht von Minamata und von dort in eine Nahrungskette, an deren Ende verschiedene Speisefische standen, die eines der Hauptnahrungsmittel eines Großteils der Bevölkerung dieser Region darstellen. Eine ähnliche Vergiftung

ereignete sich 1970 bei der japanischen Stadt Niigata am nordöstlichen Ufer der Hauptinsel Honshu. Auch hier waren Todesfälle zu verzeichnen (Takeuchi, 1968; Kurland, 1971).

Auch in Alamogordo (New Mexico, USA) erkrankten 1969 sieben Personen durch Verzehr Quecksilber- verunreinigter Nahrungsmittel. Eine Familie hatte monatelang Fleisch von einem Schwein gegessen, das mit Methylquecksilberdicyandiamid- gebeiztem Saatgetreide gefüttert worden war. Zwei Kinder und ein Jugendlicher hatten ähnliche Krankheitserscheinungen, wie sie bei der "Minamata - Disease" beobachtet worden waren (Kurland, 1971). Ein Kind, das acht Wochen nach Auftreten der ersten Krankheitserscheinungen geboren wurde, war im Alter von einem Jahr blind und in der Entwicklung stark zurückgeblieben.

Der Verzehr von importiertem, gebeiztem Saatgetreide, das entgegen seiner Bestimmung zum Brotbacken verwendet worden war, führte 1972 im Irak zu zahlreichen Erkrankungen. Über 6500 Menschen mußten dort in Krankenhäuser eingeliefert werden; von ihnen starben 459 (Bakir et al., 1973). Als Saatbeizmittel waren hier verschiedene Quecksilberverbindungen, vor allem Phenyl- und Methylquecksilberacetat sowie Methylquecksilberdicyandiamid, verwendet worden.

Neben diesen Vergiftungsfällen wurden auch in Schweden toxische Methylquecksilberanreicherungen bei Fischen und Vögeln beschrieben (Berglund und Berlin, 1969). Die Untersuchung der Fische auf ihren Hg-Gehalt erbrachte Werte von 0.02 bis 10 mg Hg/kg im Muskelfleisch, wovon der größte Teil als Methylquecksilber vorlag. Unter Berücksichtigung der bereits erwähnten Untersuchungsbefunde führten diese Messungen dazu, daß die schwedischen Gesundheitsbehörden bestimmte Fischgewässer sperrten und Fischfleisch mit einem Methylquecksilberchlorid- (MMC) Gehalt über 1 mg /kg für den menschlichen Genuß als untauglich erklärten.

Bei den bislang bekannt gewordenen Vergiftungen waren die Quecksilberverbindungen über die Nahrung in den menschlichen Körper gelangt. Dabei wurde Methylquecksilber auf zweierlei Wegen in die natürlichen Nahrungsketten befördert. In die terrestrischen Nahrungsketten gelangte es aus Methylquecksilber- gebeiztem Getreide; in die aquatischen Nahrungsketten mit den Abwässern aus der chemischen Kunststoff-, Holzverarbeitungs- und Chloralkaliindustrie (Nuorteva, 1971).

2.2 Umweltbelastung durch Quecksilberverbindungen

Durch die lokal begrenzten, akuten Massenvergiftungsfälle alarmiert, richteten die Gesundheitsüberwachungsbehörden vieler Länder ihre Aufmerksamkeit auf die Gefahren, die durch die kontinuierliche Aufnahme geringer Mengen von gesundheitsgefährdenden Umweltschadstoffen entstehen können. Um die Gefahren einer chronischen Vergiftung mit Quecksilberverbindungen besser beurteilen zu können, erschien eine Bestandsaufnahme über Vorkommen, Verbreitung und ökologische Kreisläufe dieses Umweltschadstoffes notwendig. Mit einer Vielzahl von Untersuchungen wurde deshalb versucht, die allgemeine Umweltbelastung durch Hg-Verbindungen zu erfassen. Kenntnisse über Anreicherungen und Vorkommen sowie über die Wirkungsweisen sind Voraussetzung für wirksame Maßnahmen, um gesundheitliche Gefährdungen für den Menschen erkennen und damit verhindern zu können.

Quecksilberverbindungen kommen in der Umwelt in einer Vielzahl von Formen, vom elementaren, metallischen Quecksilber bis zu gelösten anorganischen Quecksilbersalzen und organischen Quecksilberverbindungen, vor. Der Umstand, daß Mikroben im Gewässerschlamme anorganische Quecksilberverbindungen in Fabrikabfällen wie Quecksilberchlorid und organische Hg- Verbindungen methylieren und damit in die hochtoxische Form des Methylquecksilbers überführen können, macht jede

Form des Quecksilbers zu einem potentiell gefährlichen, gesundheitsgefährdenden Umweltschadstoff ersten Ranges (Henschler, 1980; Utzinger, 1980). Um einen Überblick über die Umweltbelastung mit Quecksilberverbindungen zu bekommen, wurden in zahlreichen Ländern die Hg-Gehalte von Böden, Gewässern, Nahrungspflanzen und verschiedenen Haustieren untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß Quecksilber (Hg) in äußerst geringen Konzentrationen praktisch überall in Boden, Wasser und Luft vorkommt. 50.000 t Quecksilber gelangen nach Schweizer Berechnungen jährlich in die Atmosphäre und mit dem Niederschlag in die Böden. Nur ein geringer Prozentsatz des jährlich neu geförderten Quecksilbers wird gesammelt und wiederverwendet, der Großteil geht an die Umwelt verloren und reichert sich dort an. In den Sedimenten des Genfer Sees sollen in den obersten Schichten 35 t abgelagert sein, die der Methylierung durch Bakterien zugänglich sind. Die Toleranzgrenze für Hg in Abwässern liegt in der Schweiz bei 10 ppb. Die Schweizer Grenzwerte für Trinkwasser betragen 3 ppb. Der Quecksilbergehalt von Speisefischen des Genfer Sees beträgt jedoch einige Hundert ppb, wobei die Toleranzgrenze für Hg im Fisch in der Schweiz bei 0.05 mg/kg liegt (Utzinger, 1980).

Diese Zahlen verdeutlichen, daß eine starke Akkumulation von Hg bis zum 200-fachen in den Fischen des Genfer Sees stattfindet. Ähnliche Anreicherungsfaktoren wurden auch am Ende terrestrischer Nahrungsketten gefunden. Bei einem Hg-Gehalt von 940 ppb im Boden wurde beispielsweise in hierauf erzeugten Champignons bis zu 140 ppm Hg gefunden, was einer 150-fachen Akkumulation entspricht (Utzinger, 1980).

Untersuchungen der Quecksilbergehalte in Fischen aus verschiedenen deutschen Flüssen erbrachten ähnliche Ergebnisse. Kreuzer und Hollwich (1976) z.B. stellten bei Süßwasserfischen aus deutschen Flüssen einen durchschnittlichen

Hg-Gehalt von 0.1 -0.2 ppm fest. Die Schwankungsbreite der festgestellten Hg-Gehalte war jedoch beträchtlich. So wurden bei Raubfischen, wie z.B. Hecht, aus stark belasteten Gewässern, wie dem Rhein, Hg-Gehalte von über 1 ppm gemessen. Als Anreicherungsfaktoren der Quecksilbergehalte im Fleisch von Fischen gegenüber dem durchschnittlichen Hg-Gehalt im Wasser wurden Werte von mehreren Hundert bis zum Tausendfachen ermittelt. Besonders starke Akkumulierung zeigten Raubfische wie Hechte und Barsche.

Die Gefahr einer chronischen Exposition mit Quecksilber für den Menschen geht aber nicht nur von Fischen aus. Nach Kreuzer und Hollwich (1976) wird Quecksilber heutzutage in vielen Industriezweigen für mehr als 1000 verschiedene Verwendungszwecke eingesetzt.

Das in der Zahnmedizin immer noch verwendete Amalgam, speziell das darin enthaltene Quecksilber, werden immer wieder für ungeklärte Krankheitserscheinungen verantwortlich gemacht. In einer Untersuchung von Kröncke (1981) wurde jedoch festgestellt, daß Personen mit Amalgamfüllungen keine höheren Hg-Werte im Blut und Urin aufweisen als Kontrollpersonen.

Bei Arbeitern in einer Chlor-Alkali-Fabrik, die langjährig geringen Hg-Konzentrationen durch die Raumluft ausgesetzt waren, wurden Kurzzeitgedächtnis und Merkfähigkeit überprüft. Zwischen den exponierten Personen und einer Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Schuckmann, 1981). Hg-haltige Desinfektionsmittel wurden auch bis vor kurzem noch in vielen Krankenhäusern zur Bekämpfung des Hospitalismus eingesetzt und stellten somit besonders für das Reinigungspersonal eine nicht unerhebliche Expositionsquelle dar.

Aus den angeführten Beispielen wird deutlich, daß sich die gesamte Quecksilberbelastung des Menschen aus unterschiedlichsten Quellen zusammensetzt. Der größte Teil der Hg-Menge wird jedoch mit der Nahrung und dem Trinkwasser aufgenommen. In dem Bericht der Zentralen Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundes-Gesundheitsamtes (ZEBS, 1984) sind die Aufnahmemengen von Schwermetallen nach der sogenannten "Lebensmittelkorbmethode" berechnet. Danach beträgt die wöchentliche Aufnahmemenge für Quecksilber für einen "Durchschnittsmenschen" (70kg, männlich, normale Verzehrsgewohnheiten) 0.18 mg. Die World Health Organisation (WHO) veranschlagt die wöchentlich duldbaren Aufnahmemengen auf 0.35 mg Hg. Aus diesen Zahlen errechnet sich eine prozentuale Auslastung des WHO-Wertes von 51.8 %. Bei Zugrundelegung der WHO-Höchstmengenwerte wird somit für den Durchschnittsverbraucher kein erkennbares Risiko angenommen. Bei einseitigen Verzehrsgewohnheiten, wie z.B. dem häufigen Genuß von Nieren und Wildpilzen oder Fischen aus belasteten Gewässern, können sich jedoch gesundheitliche Probleme ergeben. So würde z.B. bei Verzehr von 1 kg Fisch pro Woche, der die Toleranzkonzentration von 0.5 mg Hg/kg enthielte, der WHO-Grenzwert schon weit überschritten. Ein Vergleich der Auslastungszahlen des WHO-Wertes zeigt, daß im Zeitraum 1979 - 1984 bei Quecksilber der Wert von 30 auf 57% gestiegen ist (ZEBS, 1984).

2.3 Wirkungsmechanismen

Anorganische und organische Quecksilberverbindungen weisen in ihren toxischen Eigenschaften beträchtliche Unterschiede auf, die in der unterschiedlichen Resorbierbarkeit, Lipidlöslichkeit und damit Akkumulationsfähigkeit sowie den entsprechenden Ausscheidungsraten begründet sind. Metallisches Hg besitzt einen relativ hohen Dampfdruck und wird als Hg-Dampf durch die Lungen gut resorbiert. Anorganisches Hg reichert sich am stärksten in den Rindenschichten der Nieren und in der Leber an. Relativ hohe Konzentrationen werden auch in der Nervensubstanz erreicht.

Die toxischen Eigenschaften organischer Quecksilberverbindungen beruhen auf ihrem ionogenen Charakter und ihrer guten Resorbierbarkeit. Organische Quecksilberverbindungen können durch die Formel $R-Hg^{+} X^{-}$ charakterisiert werden (Koronowski, 1973). Die $R-Hg^{+}$ Gruppierung reagiert leicht mit freien SH-Gruppen von Proteinen und organischen Verbindungen und stellt somit einen starken Enzyminhibitor dar. Die physikalischen Eigenschaften der einzelnen Verbindungen, wie Dampfdruck, Löslichkeit und Schmelzpunkt, werden durch das Anion X^{-} bestimmt. Vom organischen Rest R wiederum hängen die Resorbierbarkeit und damit die Akkumulationsfähigkeit des Kations $R-Hg^{+}$ in tierischen und pflanzlichen Geweben ab. Die höchste Warmblütertoxizität weisen Alkylverbindungen auf, gefolgt von Phenylverbindungen, die durch geringeres Akkumulationsvermögen und leichtere Metabolisierbarkeit charakterisiert sind. Alkyloxyalkylverbindungen sind weniger gefährlich für den Menschen, da sie relativ schnell über die Nieren ausgeschieden werden können.

Organische Hg-Verbindungen werden von den Verdauungsorganen 10-40 mal leichter resorbiert als anorganische Hg-Verbindungen. Nach Koronowski (1973) beträgt die Resorptionsrate bei anorganischen Verbindungen 2-5%, bei organischen Alkyl-

verbindungen dagegen, wie z.B. beim Methylquecksilberchlorid, über 90% . Um die Empfindlichkeit verschiedener Organe gegenüber Hg-Verbindungen beurteilen zu können, sind die Verteilungskinetik dieser Stoffe im Körper und ihre jeweiligen Ausscheidungsraten wichtig. Alkylalkylverbindungen reichern sich zwar im Gehirn an, werden aber bei einer Halbwertszeit von 2-5 Tagen schnell über Nieren und Leber ausgeschieden. Für Alkylverbindungen, wie z.B. Methylquecksilber, ist dagegen eine Halbwertszeit von 70-80 Tagen ermittelt worden. Nach Henschler (1980) beträgt die biologische Halbwertszeit (HWZ) im Zentralen Nervensystem (ZNS) sogar über 100 Tage.

Bei längerer Exposition finden sich 2/3 der im Körper vorhandenen Quecksilberverbindungen in ZNS, Leber und Nieren, wobei für Methylquecksilber das Verteilungsverhältnis für diese Organe ungefähr 10 : 40 : 50 beträgt. Das Gehirn enthält zwar insgesamt weniger Hg als Leber oder Niere, reichert aber Hg gezielt in bestimmten Regionen an (Koronowski, 1973). Obwohl alle funktionellen Proteine im Körper potentielle Ziele für Hg-Verbindungen sind, wird dennoch eine hohe Organspezifität beobachtet. Die schädigende Wirkung auf unterschiedliche Zielorgane bzw. -gewebe ist durch die Metallspezifität der Thiol-Bindung der Schwermetalle bedingt; so reagiert Quecksilber mit anderen SH-Gruppen als beispielsweise Blei (Schilcher, 1985). Warum gerade bestimmte Enzyme der Nierentubuli und einige Regionen des Gehirns gegenüber Hg besonders empfindlich sind, ist nicht bekannt (Rothstein, 1971; Kurland, 1971; Henschler, 1980). Bei chronischen Hg-Vergiftungen stehen die toxischen Wirkungen auf das ZNS im Vordergrund. Unter dem Begriff Mercurialismus werden die klinischen Erscheinungen zusammengefaßt, die durch motorische Störungen wie Ataxien, Lähmungen, Zittern, mentale Beeinträchtigungen (wie Konzentrations- und Erinnerungsschwächen) und sensorische Ausfälle gekennzeichnet sind (Venugopal und Luckey, 1978; Henschler, 1980).

2.4 Höchstmengenfestlegung

Nachdem in den 60-er Jahren als Ursache für die verschiedenen Vergiftungsfälle organische Hg-Verbindungen und speziell Methylquecksilber nachgewiesen worden waren, wurden von vielen nationalen Gesundheitsbehörden tierexperimentelle Forschungen angeregt, um weitere Daten für die Festlegung von Höchstmengen zu erhalten und um darauf aufbauend durch Anwendungs- und Verzehrsverbote die Risiken dieser toxischen Umweltchemikalie einzuschränken. Bei der Festlegung von Grenzwerten wird üblicherweise von der kleinsten wirksamen Dosis (LED = lowest effective dose) ausgegangen, bei der noch Krankheitserscheinungen oder pathologisch anatomische Veränderungen beobachtet werden können. Davon ausgehend werden Dosen und Konzentrationen bestimmt, die auch bei langfristiger Einwirkung keine toxischen Effekte mehr auslösen sollten. Aus solchen Werten werden unter Einbeziehung von Sicherheitsfaktoren und unter Berücksichtigung des sozio-ökonomisch Zumutbaren Grenzwerte für maximale Konzentrationen bzw. tägliche Aufnahmemengen (ADI = acceptable daily intake) abgeleitet (Koronowski, 1973; Henschler, 1980). Die Grundlage für die Festlegung von Toleranzwerten waren bisher vor allem die Ergebnisse pathologisch-anatomischer, histologischer, biochemischer und eventuell einfacher Verhaltensuntersuchungen. Auf der Basis solcher Untersuchungsergebnisse wurden von der World Health Organisation (WHO) die duldbaren wöchentlichen Aufnahmemengen von Hg auf 0,35 mg/70 kg KG, der Höchstgehalt von Quecksilber in Fisch auf 0,5 ppm und in anderen Lebensmitteln auf 0,05 ppm festgesetzt.

In verschiedenen systematischen und standardisierten verhaltenstoxikologischen Untersuchungen wurden nun aber bereits nach Dosen Verhaltensänderungen gefunden, die bislang zu keinen klinisch faßbaren Erscheinungen geführt hatten. Hughes et al. (1975) folgerten daraus, daß die auf aus-

schließlich klinischen Untersuchungen basierenden Grenzwerte revidiert werden müssen, sobald deutliche Verhaltensänderungen als weiteres Kriterium für die Festlegung herangezogen würden.

2.5 Tierexperimentelle Untersuchungen

Obwohl die toxischen Effekte akuter und chronischer Hg-Aufnahme in den letzten Jahren eingehender beschrieben wurden, liegen bisher nur wenige systematische Untersuchungen über die möglichen Auswirkungen von Quecksilber auf das Verhalten vor (Zenick, 1974). Dabei wurden von den nationalen Gesundheitsbehörden immer wieder verhaltenstoxikologische Untersuchungen als Ergänzung für die Zulassung von Arzneimitteln oder die Festlegung von Schwellenwerten gefordert. Japan war eines der ersten Länder - vielleicht auf Grund der Erfahrungen bei der Minamata-Katastrophe -, das Verhaltenstestungen an Tieren als Bestandteil von Sicherheitsabschätzungen bei der Zulassung neuer Arzneimittel zwingend vorschrieb (Vorhees u. Butcher, 1982). In Großbritannien gibt es ähnliche Vorschriften. Eine nähere Präzisierung der dabei anzuwendenden verhaltenstoxikologischen Tests gab es jedoch bislang nicht. Adäquate Verhaltenstests sollten in Zusammenarbeit der Zulassungsbehörden mit den Arzneimittelherstellern bestimmt werden. Übereinstimmung herrscht darüber, daß eine Prüfung sensorischer und motorischer Funktionen sowie komplexe Verhaltensweisen, wie Diskriminations- und Lernprozesse, in die Risikoabschätzungen mit einbezogen werden sollten (Weiss u. Laties, 1979; Buelke-Sam et al., 1979).

Die Forderung nach Verhaltenstests als Teil von Zulassungsprüfungen beruhen nicht nur auf epidemiologischen Erfahrungen, sondern auch auf Untersuchungsergebnissen verschiedener Forschungsgruppen, die Verhaltensmessungen als sensibleren Indikator zur Erfassung von Schadwirkungen als die gegenwärtig benützten klinischen Tests (Spyker et al., 1972; Hughes et al., 1975; Bornhausen et al., 1980) erkannt hatten. Spyker et al. (1972) beispielsweise wiesen durch Messen des Spring- und Schwimmverhaltens junger Mäuse neurotoxische Wirkungen von organischen Hg-Verbindungen bei Dosen nach, die histologisch nicht faßbar waren.

Im Gegensatz zu verschiedenen verhaltensteratologischen Untersuchungen zur Wirkung dieser neurotoxischen Substanz wurden nur relativ wenige verhaltenstoxikologische Untersuchungen an adulten Laboratoriumstieren durchgeführt.

Hughes et al. (1975) fanden bei jungen Ratten, die im Alter von 4, 5 und 6 Wochen jeweils 0.005 mg MMC i.p. erhalten hatten, eine Beeinträchtigung des Lernverhaltens. Jede der Injektionen enthielt 0.005 mg Methylquecksilberchlorid (MMC) - unter Berücksichtigung des jeweiligen Gewichts ergibt sich eine Gesamtdosis von ungefähr 0.2 mg/kg KG. Das Verhalten der Tiere wurde im Alter von 70 Tagen in einem "Avoidance Escape"- Test überprüft. Dabei konnten die Tiere durch Wechseln der Seiten in einem zweigeteilten Käfig eine Lärmbelästigung von 110 dB vermeiden, wenn sie die konditionierte Verhaltensreaktion innerhalb von 10 Sek. nach dem Auftreten eines Lichtsignals zeigten ("Avoidance response"). Gelang ihnen dies in dem Zeitintervall nicht, konnten sie durch Käfigseitenwechsel sowohl das Lichtsignal als auch den Lärm löschen ("Escape response"). Gemessen wurden die Anzahl der Avoidance-Reaktionen und die Zeitdauer bis zum Einsetzen der Escape-Reaktion in drei verschiedenen Versuchsblöcken. Dabei zeigten die mit Hg behandelten Tiere deutlich weniger Vermeidungsreaktionen und sogar eine Zu-

nahme der Escape-Latenzzeiten vom ersten bis zum dritten Versuchsblock. Erwachsene Tiere, die eine äquivalente MMC-Dosis erhalten hatten, wiesen in diesen Tests keine Beeinträchtigung ihrer Verhaltensleistung auf.

Post et al. (1973) fanden nach einmaliger oraler Applikation von MMC (20mg/kg KG) bei 15 bis 21 Tagen alten Ratten sowie bei 60 Tage alten Ratten (25mg/kg KG) weder histopathologische Veränderungen der Gehirne noch Verhaltensunterschiede im "Open Field Test" gegenüber den Kontrolltieren. Eine halbe Stunde nach der Behandlung zeigten die Tiere jedoch Lethargie und Ataxien, erschienen aber nach drei Stunden wieder völlig normal. Bei der Verhaltenstestung im T-Labyrinth jedoch wurden bei den 60 Tage alten Tieren nach der Behandlung mit 25mg/kg signifikante Leistungsdefizite festgestellt. Die Autoren schließen aus ihren Untersuchungen, daß subtile Veränderungen in Folge einer Hg-Vergiftung besser mit Verhaltenstests als durch histopathologische Untersuchungen aufgedeckt werden können.

In einer weiteren verhaltenstoxikologischen Untersuchung konnten Salvaterra et al. (1973) bei erwachsenen Mäusen, die i.p. 5 oder 10 mg Methylquecksilberhydroxid/kg KG erhalten hatten, im "Open Field Test" signifikante Verhaltensänderungen nachweisen, welche bei beiden Gruppen eine und drei Std. nach der Applikation auftraten. In einer dritten Testsitzung 72 Std. später wurden bei diesen Gruppen allerdings keine Abweichungen mehr gegenüber den Kontrollen festgestellt. Eine zusätzliche 1.0 mg/kg -Gruppe war in allen drei Testsitzungen unauffällig.

Müsch (1980) applizierte 4 Monate alten Ratten 4 x 0.05 mg MMC/kg KG. Mit dem instrumentellen Konditionierungsverfahren "Differential Reinforcement of High Rate" (DRH) konnten dabei keine Verhaltensdefizite festgestellt werden.

Bei den oben angeführten tierexperimentellen Arbeiten mit Hg-Verbindungen wurden neben einfachen qualitativen Verhaltenstests, wie solchen im "Open Field", oder "T-Labyrinth" auch operante Testverfahren aus dem Bereich der instrumentellen Konditionierung eingesetzt (Hughes et al., 1975; Müsch, 1980). Nach Laties et al. (1977) sind bei verhaltenstoxikologischen Untersuchungen zwei generelle Vorgehensweisen anerkannt. Es sollten nämlich nur solche Verhaltenstests durchgeführt werden, welche Aktivitätsänderungen und die operanten Verhaltensweisen gemeinsam berücksichtigen. Ferner sollte quantitativen, leicht reproduzierbaren und dennoch sensitiven Testverfahren der Vorzug gegeben werden.

2.6 Verhaltenstestung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das Lernleistungsvermögen von adulten, männlichen Ratten quantitativ zu erfassen, die im Alter von 4 Monaten mit organischen Hg-Verbindungen belastet worden waren. Die dabei aus dem Bereich der operanten Konditionierung eingesetzten Testverfahren beruhen auf den Grundlagen von Ferster u. Skinner (1957). Gegenüber einfachen, mehr qualitativen Verhaltenstests, wie dem bereits erwähnten "Open Field Test" oder summarischen Motilitätsmessungen, liefern instrumentelle Verhaltenstests direkte numerische Daten, die ohne Beeinflussung der Versuchstiere durch den Experimentator registriert werden. Auch die bei herkömmlichen Testverfahren oft unvermeidliche subjektive Beurteilung der Verhaltensleistung entfällt (Bornhausen, 1983). Die apparativ durchgeführte Registrierung der Verhaltensleistung erlaubt eine zeitlich uneingeschränkte Verhaltensbeobachtung. Aus dem Repertoire der operanten Konditionierungsverfahren wurden die "Bestärkung großer Verhaltenshäufigkeiten (Differential Reinforce-

ment of High Rate (DRH)" und die "Bestärkung geringer Verhaltenshäufigkeiten (Differential Reinforcement of Low Rate (DRL)" ausgewählt.

Zur Messung des operanten Verhaltens der Versuchstiere standen zehn sogenannte Skinner-Boxen als Testapparatur zur Verfügung. Die grundsätzliche Eignung der Methodik zum Nachweis von Methylquecksilberchlorid-induzierten Verhaltensänderungen war bereits früher erbracht worden (Müsch et al., 1978; Bornhausen et al., 1982). Da in der Literatur nur wenige verhaltenstoxikologische Untersuchungen bei erwachsenen Tieren und insbesondere bei Ratten beschrieben sind, wurde bei der Auswahl der Dosisbereiche auf eine früher durchgeführte Verhaltensuntersuchung mit 4×0.05 mg MMC/kg KG aufgebaut. Auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit einer gleichzeitig im Institut durchgeführten verhaltensteratologischen Arbeit sollte gewährleistet sein. In den vorliegenden Versuchen wurden deshalb den Tieren an zehn aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 0.05 , 0.5 oder 2.0 mg MMC/kg KG mittels Schlundsonde appliziert. Die umwelttoxikologische Bedeutung und die besondere Neurotoxizität von organischen Hg-Verbindungen waren maßgebend für die Verwendung von Methylquecksilberchlorid als Testsubstanz.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen erfolgten an 50 Albino-Ratten (Stamm Wistar Neuherberg). Die seit Generationen Ingezüchteten Tiere wurden unter SPF-Bedingungen aufgezogen und im Alter von 14 Wochen aus den zentralen Tierzuchtstallungen in die Unterbringungsräume der Abteilung für Strahlenbiologie, Arbeitsgruppe Strahlenphysiologie, der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), 8042 Neuherberg, verbracht. Um einen Einfluß des Sexualzyklus auszuschließen, wurden für die Versuche ausschließlich männliche Tiere, mit einem Durchschnittsgewicht von 300 Gramm und in einem Alter von 4 Monaten, als Versuchstiere verwendet.

3.2 Haltung

Die Versuchstiere waren in einem schallgedämpften, vollklimatisierten Raum mit 15 qm Grundfläche und 3,5 m Höhe untergebracht. Für die zentrale Klimasteuerung wurden die Richtlinien der NCTR/FDA (1980)-Studien zu Grunde gelegt (Raumtemperatur 23 Grad Celsius, relative Luftfeuchtigkeit 55 - 65 %). Mittels einer Zeitschaltuhr (Modell Steck-O-Matic, Grässlin Schwelz, Typ STA) herrschte in den Tierräumen ein konstanter, 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus, wobei die Umschaltungen jeweils um 07 Uhr und 19 Uhr (MEZ, ohne Berücksichtigung der Sommerzeit) erfolgten. Weiße Leuchtstoffröhren an der Decke des Raumes beleuchteten den Raum einheitlich mit 250 Lux. Die Beleuchtungsstärke schwankte innerhalb der Tiergestellflächen zwischen 50 und 100 Lux. In 1.80 m Höhe wurden 200 Lux gemessen. Die Tiere waren einzeln in Standard-Makrolonkäfigen (40 x 25 x 15 cm), die auf der Oberseite mit Drahtgittern für die Aufnahme von Futter und Wasserflasche versehen sind, untergebracht.

Als Einstreu dienten saugfähige Sägespäne für Urin- und Kotaufnahme der Tiere. Einmal wöchentlich wurden die Käfige durch Käfige mit frischer Einstreu ersetzt. Die Makrolon-Käfige mit den Tieren wurden in einem Metallgestell eingehängt, wobei jeweils fünf Käfige übereinander und vier nebeneinander eine Einheit mit 20 Tieren bildeten.

Futter (Altromin Standard-Diät für Ratten Nr.1314) und Trinkwasser (Leitungswasser) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Das Trinkwasser in Nippelflaschen wurde zweimal pro Woche erneuert.

Die gesundheitliche Überwachung der Tiere erfolgte durch regelmäßiges Wiegen aller Tiere, Beobachten des Futterverbrauchs, Anfertigen von Abklatschpräparaten der Analregion mit Untersuchung auf Magen und Darmparasiten. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Beschaffenheit des Felles gewidmet (Farbveränderung, Zustand der Haare, Glanz u.s.w.), da das Fell der Ratten, wie Jung (1962) es ausdrückt, ein "Spiegel des Gesundheitszustandes dieser Tiere" ist.

Der Umgang und die Handhabung der Tiere erfolgte nach den NCTR-Richtlinien (1980) unter Einbeziehung der Empfehlungen der allgemeinen und speziellen Versuchstierkunde (Köhler et al., 1978), sowie den Empfehlungen von Hagemann und Schmidt (1960).

3.3 Behandlung

Vor Beginn der Behandlung wurde das Durchschnittsgewicht aller Versuchstiere ermittelt, um die verschiedenen Stammlösungen für die Applikationslösungen herzustellen.

Da die Versuche als Blindstudie geplant waren, wurden die Lösungen codiert und erst nach Beendigung aller Verhaltensuntersuchungen decodiert.

Den Tieren wurde per Schlundsonde wassergelöstes Methyl-Quecksilber-Chlorid (MeHgCl) verabreicht (Hersteller: Merck - Schuchardt, Hohenbrunn bei München, Artikel-Nr. 800100, 98% CH_3ClHg). Die Schlundsonde bestand aus einer 2 ml Einzelspritze mit einem elastischen 3 mm $\varnothing$ starken, etwa 8 cm langen Polyäthylen-Schlauch. Die am Nackenfell manuell fixierten Tiere erhielten an zehn aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 ml Lösung per Schlundsonde appliziert. Der Behandlungsbeginn war jeweils 18 Tage vor Beginn der Verhaltenstestung. Der Applikationszeitpunkt lag immer am Vormittag zwischen 10 und 11 Uhr.

Die Blindstudie umfaßte folgende Dosisgruppen:

10 x 1 ml Aqua dest. (Kontrolle)		
10 x 0,05 mg MeHgCl /kg Körpergewicht		
10 x 0,5 mg	"	"
10 x 2,0 mg	"	"

Während der 4-wöchigen Behandlungsdauer wurde besonders aufmerksam auf Verhaltensänderungen sowie Futter- und Wasseraufnahme der Tiere geachtet. Auch wurde die Gewichtsentwicklung während der Behandlungs- und Testsitzungen verfolgt. Um bei allen Tieren gleiche Abstände zwischen Behandlungsende und Testung der Verhaltensleistung zu gewährleisten, wurde die Behandlung der einzelnen Dosisgruppen in

einer Staffe lung mit wöchentlichen Abständen durchgeführt. Eine Woche nach Behandlungsende wurden die Tiere dann jeweils mit dem ersten Lerntest konfrontiert.

Beim Verhaltenstestbeginn bestand jede Testgruppe aus 10 männlichen Tieren.

3.4 Versuchsgruppen

Nach einer Eingewöhnungszeit von einer Woche wurden aus 50 männlichen Tieren, die 15 Wochen alt waren, vier zufällig zusammengesetzte Versuchsgruppen zu je 10 Tieren gebildet. Hierzu wurde den Tieren eine fortlaufende Nummer zugeteilt. Aus der Grundgesamtheit von 40 Tieren wurden dann die vier Versuchsgruppen, entsprechend den vier Dosisgruppen, nach dem Zufallszahlenprinzip 10 aus 40 (Köhler, 1978), zusammengestellt. Die Versuchstiergruppen erhielten die Bezeichnung A - D, wobei die Tiere der Gruppe A, entsprechend der Reihenfolge der Zufallszahlenauswahl, mit den Nummern 1 -10 versehen wurden. Die Kennzeichnung der Tiere erfolgte mit wasserfester Tinte (Edding 1800) durch Nummernauftrag auf die Schwanzoberseite. Mit den Tieren der anderen Versuchsgruppen wurde ebenso verfahren. Die restlichen zehn Tiere bildeten eine Zusatzgruppe, die von jeglichen Manipulationen, wie z.B. Schlundsondierung oder Verhaltenstestung, ausgeschlossen war und nur in ihrer Gewichtsentwicklung beobachtet wurde. Die Versuchstiere wurden gruppenweise zusammengesetzt und verblieben in dieser Einteilung während des gesamten Versuchszeitraumes. Nur zur Verhaltenstestung wurden die Tiere aus ihrer gewohnten Umgebung in andere Räume gebracht. Um für alle Tiere möglichst einheitliche Versuchsbedingungen zu gewährleisten und individuelle Einflüsse auszuschalten, wurde beim Transport und dem Einsetzen der Tiere in die Testboxen immer nach dem gleichen Schema verfahren.

3.5 Versuchsanlage

3.5.1 Tierwaage

Für die Gewichtsermittlung der Tiere stand eine Waage (Modell Sartorius, Mod.Nr. 3716 MP) zur Verfügung, die von einem Mikrocomputer (Commodore VC 20) gesteuert wurde. Da sich die Tiere beim Wägevorgang nicht absolut ruhig verhielten, wurde aus 5 Einzelwägungen ein Mittelwert gebildet und als aktuelles Tiergewicht ausgedruckt.

3.5.2 Versuchsräume

Die Verhaltensuntersuchungen fanden in einem separaten, besonders ruhig gelegenen, schallgedämpften Innenraum ohne Fenster statt. Während der Versuchszeiten waren dessen Zugänge durch Absperren und permanentes rotes Blinklicht gesichert, um eine unbeabsichtigte Störung der Tiere zu vermeiden.

Die klimatischen Bedingungen dieses Raumes entsprachen durch die zentrale Klimasteuerung denen des Tierhaltungsraumes. Wegen der beabsichtigten zusätzlichen Testung der Hell-Dunkel-Diskrimination der Versuchstiere während der Verhaltenstests war der Testraum nicht an den zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus angeschlossen. Die Raumbeleuchtung blieb während aller Testsitzungen ausgeschaltet.

3.5.3 Testboxen

Die Verhaltensuntersuchungen in den standardisierten Versuchskäfigen begannen eine Woche nach Beendigung der Schwermetallexposition. Diese Versuchskäfige oder "Skinner'schen Testboxen" (Abb. 3.1) bestanden im einzelnen

aus: Plexiglas-Käfig

Interaktionswand

Futterautomat und den entsprechenden elektrischen
Steuer- und Registrierkabelverbindungen

Der Plexiglaskäfig hatte folgende Maße: Länge = 30cm, Breite = 25cm, Höhe = 50cm. Der Boxenboden bestand ebenfalls aus einer Glasscheibe. Zur Abdeckung der Box wurde wegen der besseren Entlüftung ein Drahtgitter verwendet, das zum Einsetzen der Tiere abgenommen werden konnte. An der inneren Stirnseite der Testkammer ist ein Druckhebel aus Metall (Eigenbau nach Muster BRS/LNE, Modell, CRL-005) 4 cm über dem Boxenboden angebracht. Die benötigte Auslösekraft kann über die Hebelaufhängung variiert werden und wurde auf 30p ($\pm 2p$) bei den männlichen Tieren einjustiert und nach jeder Testserie überprüft. Über einen Schaltmechanismus war der Hebel mit einem Futterautomaten (Gerbrands, Modell D-1) verbunden, der bei programmgemäßen Betätigen des Hebels ein Futterkügelchen (Noyes Precision Food Pellet, Standard, Formula 45 mg) über ein Plastikrohr ins Innere der Testbox abgibt. Dort befindet sich auf gleicher Höhe, direkt neben dem Druckhebel, ein Auffangbehälter für die Futterpellets. Durch diese Konstruktionsanordnung soll dem Versuchstier die Assoziation "Hebelndruck = Futterpille" erleichtert werden. Auch wird damit der Zeit- und Bewegungsaufwand für das Tier beim Fressen möglichst gering gehalten und damit auch einem der Grundprinzipien bei Verhaltenstests Rechnung getragen: Bestärkung einer Verhaltensreaktion unmittelbar nach der Reaktion. Direkt über dem Metallhebel sind zwei Lämpchen mit einer weißen und einer grünen Abdeckungskappe angebracht. Durch weißes Blinklicht wird jeder Hebeldruck angezeigt, der in einer Hellphase erfolgt. Das grüne Licht markiert bei Programmen, die eine Pause beim Hebeldrücken vom Tier fordern, das Ende des Pausenintervalls und damit die Möglichkeit, ein neues Futterpellet zu erhalten. Die

Hellphasen Im Versuchsablauf werden durch eine zusätzliche weiße Käfigbeleuchtung über der Hebelvorrichtung angezeigt. Der Boden der Versuchskammern wurde mit einer Lage von Sägespänen zur Aufnahme der Exkremente eingestreut. Trinkwasser (Leitungswasser) stand den Tieren während der Verhaltenstestung ad libitum zur Verfügung.

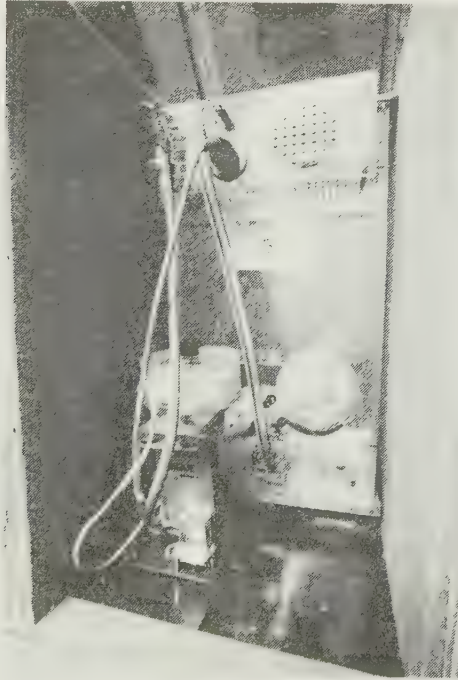


Abb. 3.1: Skinnerbox mit Futterautomat (unten links) sowie entsprechende Steuerungs- und Isolationseinrichtungen

Fünf Einzelboxen waren zu einer Bau- und Steuereinheit zusammengefaßt (Abb. 3.2). Durch Trennwände zwischen den Einzelboxen wurde der Sichtkontakt der Tiere untereinander verhindert. Zwei solche selbstgebaute Fünfeinheiten (GSF - Eigenbau), also 10 identische, automatisch gesteuerte Skinnerboxen, standen als Versuchsanordnung zur Verfügung.



Abb. 3.2.: Fünf zu einer Baueinheit zusammengefaßte Skinner-Boxen mit aufgeklappten Isolationseinrichtungen

3.5.4 Steuerungsanlage

Test-Programmsteuerung und Datenregistrierung aus den zehn Versuchsboxen erfolgten von einem Nebenraum aus, um eine Beeinflussung der Testtiere durch den Experimentator oder durch eventuelle Maschinengeräusche auszuschließen. Jede Testbox der beiden Fünfeinheiten war über einen eigenen Einschub an einen gemeinsamen Steuerapparat angeschlossen, der die Programmeinstellung und die Registrierung der anfallenden Daten ermöglichte. Mit einer Zeitschaltuhr konnten die Hell- und die Dunkelphasen einer Versuchssitzung in beliebige Minutenintervalle eingeteilt werden. Auch die Anzahl der gewünschten Durchläufe der Hell- Dunkelperioden konnte vorgegeben werden. Bei den vorliegenden Verhaltens-tests war die Dauer der Hellphasen auf 30 min und die der Dunkelphasen auf 60 min bemessen. Dieser 90 min Hell-Dunkel-Rhythmus wiederholte sich entsprechend der Test-sitzungsdauer von drei Tagen 48 mal. Für jede Versuchsbox getrennt, wurde die Anzahl der Hebeldrücke während der Hellphasen (HDH), der Dunkelphasen (HDD) und die Anzahl der belohnten Hebeldrücke (Re) aufsummiert. Der Steuerautomat selbst wurde von einem Mikrocomputer (Commodore CBM 4032) überwacht, der die anfallenden Daten über ein Diskettenlaufwerk auf 5 1/4" Disketten abspeicherte. Neben den Hebeldrücken selbst wurde auch die zeitliche Aufeinanderfolge der einzelnen Hebeldrücke registriert und abgespeichert. Diese Datenspeicherung ermöglichte eine detaillierte Auswertung individueller und gruppenspezifischer Verhaltensleistungen. Spezielle Auswerte- und Plottprogramme schließlich erleichterten eine übersichtliche graphische Darstellung der Ergebnisse durch an den Rechner gekoppelte Druck- und Zeichengeräte.

Aus Gründen der Funktionssicherheit war die gesamte Steuer- und Erfassungsanlage an ein Notstromaggregat angeschlossen, das automatisch die Stromversorgung bei zentralen Energie-

schwankungen oder -ausfällen übernahm. Aufbau und Steuerungsprinzipien wurden von Matthes et.al. (1982) beschrieben. Der Gesamtaufbau der Steuerungs und Erfassungseinrichtung ist aus Abb.3.3 a und b ersichtlich.

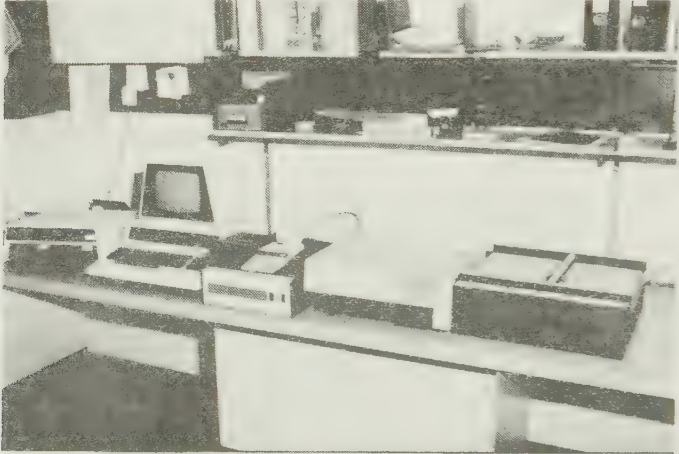


Abb. 3.3 a: Datenerfassungsanlage (Rechner, Drucker und Plotter)

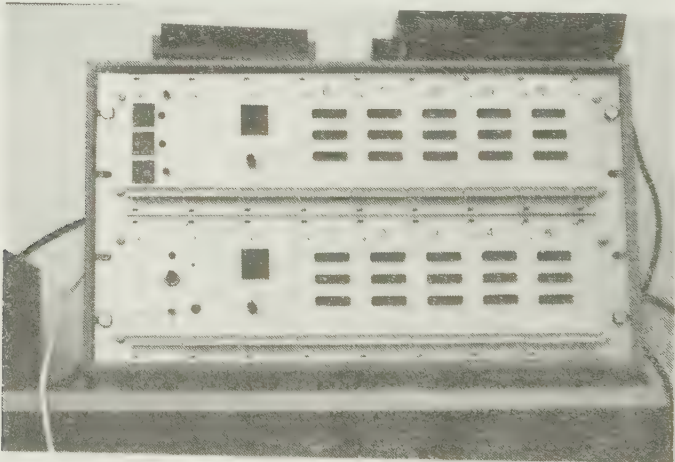


Abb. 3.3 b: Steuerapparat

3.6 Verhaltenstestung

3.6.1 Programmgrundlagen

Die Methoden, die zur Untersuchung des Lernvermögens der Tiere angewandt wurden, basieren auf den Prinzipien des operanten Verhaltens. Hier wurde versucht, die Häufigkeit einer gewünschten Verhaltensreaktion zu erhöhen, indem das Tier immer dann belohnt wurde, wenn es die gewünschte Reaktion zeigte. In unserem Ansatz bedienten wir uns der Belohnung (= positive reinforcement) als Leistungs- und Lernanreiz. Durch Belohnungen lassen sich im Gegensatz zu "Bestrafungen" schnellere und nachhaltigere Lernerfolge erzielen. Ferner kann auch durch diese Art der Verhaltensbestärkung dem Tierschutzgedanken einer möglichst schonenden Behandlung der Tiere besser Rechnung getragen werden. Bei den hier beschriebenen Verhaltenstests war die geforderte Verhaltensreaktion "Hebeldrücken". Der Leistungsanreiz bestand in einer Futterbelohnung (Futterkügelchen $\bar{a}$ 45mg). Um eine im Versuchskäfig befindliche Ratte zu veranlassen, einen Hebel zu drücken, müssen verschiedene Voraussetzungen gegeben sein. Erstens muß beim Versuchstier eine spezifische Motivation vorhanden, und zweitens muß die Bestärkung des gezeigten Verhaltens motivationspezifisch sein (Angermeler, 1976). Mit anderen Worten: Durch Futterbelohnungen wird eine Ratte nur dann dazu angeregt werden können, eine bestimmte Verhaltensreaktion (Hebeldrücken) vermehrt zu zeigen, wenn sie auch hungrig ist.

Zur Vorbereitung auf die Testung in den ausgewählten Lernprogrammen wurde das Versuchstier nach dem Prinzip der kontinuierlichen Bestärkung mit Futterpellets versorgt, sooft es das gewünschte Verhalten (Hebeldrücke während der Hellphasen) zeigte. Allen diesen Verstärkungsmodellen ist gemeinsam, daß die Bestärkung (Belohnung) der Wirkreaktion (Hebeldrücken) unmittelbar folgen muß (Angermeler, 1976).

3.6.2 Testprogramme

Alle Versuchstiere durchliefen drei Verhaltenstests mit unterschiedlichen Lernanforderungen. Anstelle eines vorbereitenden Trainings hatten die Tiere in dem ersten Testprogramm Gelegenheit, gleichzeitig die Indikator­tätigkeit des Hebeldrückens zu erlernen. Außerdem sollte das Diskriminationsvermögen der Tiere für Hell-Dunkelphasen untersucht werden.

Bestärkungsschema: "Differential Reinforcement of High Rate" (DRH)

Das instrumentelle Konditionierungsverfahren DRH (Ferster u. Skinner, 1957) ist ein Bestärkungsschema großer Verhaltenshäufigkeiten. Dieses Verfahren verlangt vom Versuchstier eine bestimmte Anzahl von Hebeldrücken in einem bestimmten Zeitintervall, um eine Futterbelohnung zu erhalten. Ein neues Intervall beginnt mit dem ersten Hebel­druck nach Erhalt einer Belohnung oder mit dem ersten Hebeldruck nach Ablauf des vorhergegangenen Zeitintervalls. Die Anzahl der geforderten Hebeldrücke in einem Zeitintervall und die Dauer des Zeitintervalls selbst, können am Steuerautomaten eingestellt werden. Solche Bestärkungsschemata großer Verhaltenshäufigkeiten werden oft bei Hirn­läsionsversuchen angewendet (Angermeier, 1976).

D R H 2/1

Das erste Testprogramm unserer Versuchsreihe, die DRH-Stufe 2/1, verlangte von den Tieren, zweimal den Hebel innerhalb eines Intervalls von einer Sekunde zu drücken, um ein Futterpellet zu erhalten. Als Abkürzung hierfür wurde die Bezeichnung DRH 2/1 gewählt. Da ein vorbereiten­des Training zum Erlernen der Indikator­tätigkeit bei den männlichen Ratten nicht unbedingt erforderlich schien, wie

sich in Vorversuchen zur Programmfestlegung ergeben hatte, erfolgte der Einstieg in die Verhaltenstestung auf diesem relativ hohen Niveau der Lernanforderung. Den Tieren standen aber drei Tage zur Verfügung, um sich in ihrem Verhalten dem Lernprogramm anzupassen.

D R H 4/2

Drei Wochen nach der ersten Verhaltenstestung (siehe Zeitplan) wurde in einer zweiten Sitzung von zusammen 3 x 24 h die Lernanforderung erhöht. Für das Testprogramm DRH 4/2 mußten die Tiere viermal den Hebel innerhalb von zwei Sekunden betätigen, um belohnt zu werden. Die Hebeldrücke mußten hier sehr schnell aufeinander folgen, um das zur Verfügung stehende Zeitintervall nicht zu überschreiten. Somit wurden bei diesem Programm besondere Anforderungen an die Aktivität der Tiere gestellt.

Bestärkungsschema: "Differential Reinforcement of Low Rate" (DRL)

Im Gegensatz zum DRH- Bestärkungsschema werden beim DRL-Schema (Ferster u. Skinner, 1957) geringe Verhaltenshäufigkeiten bestärkt. Dieses Testverfahren bietet besondere Vorteile dann, wenn von den Testsubstanzen eine Beeinträchtigung der Erregbarkeit oder eine Minderung des Aktivitätspotentials der Versuchstiere erwartet wird. Bei dem hier ausgewählten DRL- 1/8 Programm mußten die Tiere jeweils eine Pause von acht Sekunden nach jedem Hebeldruck einhalten, um wieder für den nächsten folgenden Hebeldruck belohnt werden zu können. Um den Tieren das Einhalten der geforderten Pausen zu erleichtern, leuchtete nach Beendigung der Pause ein grünes Lämpchen auf. Fiel ein Hebeldruck in die geforderte Wartezeit von acht Sekunden, erhielt das Tier keine Futterbestärkung, und das 8-Sek. Sperrinter-

vall begann aufs neue. Bei diesem Testverfahren treten die Ansprüche an die Aktivität der Tiere in den Hintergrund. Stattdessen wird von den Tieren eine weniger von der Motorik bestimmte Bewältigung der Testsituation gefordert. Die Reihung der verschiedenen Testverfahren und ihrer Abstufungen entsprach somit dem Konzept, Lernfähigkeitsänderungen durch verschiedene Methoden zu erfassen, die sich in ihren Aussagen gegenseitig stützen können. Damit war eine sinnvolle Ergänzung der vorhergehenden Testschemata gegeben.

3.6.3 Zeitplan

Die Verhaltensuntersuchungen erstreckten sich über einen Zeitraum von zwölf Wochen. Dabei wurden jeder Dosisgruppe insgesamt drei Testsitzungen abverlangt, in denen unterschiedliche Anforderungen an das Lernvermögen der Tiere gestellt wurden. Eine Testsitzung mit gleichbleibendem Schwierigkeitsgrad dauerte jeweils 3 x 24 h. Jede Testsitzung war darüberhinaus in 30- min Hell- und 60- min Dunkelphasen eingeteilt. Nur Hebeldrücke während der Hellphasen wurden belohnt. Somit standen den Tieren pro Sitzungstag nur 8 Stunden zur Verfügung, um für Hebeldrücke Futter zu erhalten. Diese Hell-Dunkel-Phaseneinteilung wurde gewählt, um bei den Tieren eine frühzeitige Sättigung und damit einen Motivationsverlust zu verhindern. Auch wurde wegen der langen Versuchsdauer den Tieren vor den Testsitzungen das Futter nicht entzogen, um der Gefahr zu entgehen, daß Tiere, die die Testanforderungen längere Zeit nicht erfüllten, wegen des eingetretenen Energieverlusts das Hebeldrücken gänzlich einstellten. Die daraus resultierende geringe Motivation der Tiere zu Versuchsbeginn wurde dabei in Kauf genommen. Die Versuche liefen Tag und Nacht, um die Einflüsse des besonderen Aktivitätsrhythmus der Nagetiere zu berücksichtigen. Um Datenverlusten vorzubeugen, wurden die Datenerfassungsträger in 24-stündigen Intervallen ausgewechselt. Zusätzlich wurden alle auf Disketten gespeicherten Daten in regelmäßigen Intervallen ausgedruckt und in Versuchsprotokollen festgehalten. Der zeitliche Versuchsablauf ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Aus überwachungs- und arbeitstechnischen Gründen wurden die verschiedenen Testreihen immer unter der Woche von Dienstag 0900 Uhr bis Freitag 0900 Uhr durchgeführt.

Tabelle 1: Zeitliche Folge der Testsitzungen

Testschema D R H 2/1				
1-te Wo	Gruppe	A	3 x 24 h	
2-te Wo	Gruppe	B	"	
3-te Wo	Gruppe	C	"	
4-te Wo	Gruppe	D	"	
Testschema D R H 4/2				
5-te Wo	Gruppe	A	3 x 24 h	
6-te Wo	Gruppe	B	"	
7-te Wo	Gruppe	C	"	
8-te Wo	Gruppe	D	"	
Testschema D R L 1/8				
9-te Wo	Gruppe	A	3 x 24 h	
10-te Wo	Gruppe	B	"	
11-te Wo	Gruppe	C	"	
12-te Wo	Gruppe	D	"	
Stoffwechselversuche				
11-te Wo	3 Tiere	Gruppe A	72 h	
12-te Wo	3 "	" B	"	
13-te Wo	3 "	" C	"	
14-te Wo	3 "	" D	"	

Dauer der Testsitzungen: insgesamt 12 Wochen

Dauer der Stoffwechselversuche: 4 Wochen

3.6.4 Hell- Dunkel- Diskriminierung

Die Hell- Dunkel- Diskriminierung stellte an die Tiere eine über alle Verhaltenstestreihen gleichbleibende, zusätzliche Lernanforderung. Alle Tests wurden in einem ständigen und gleichbleibenden Hell- Dunkel- Rhythmus durchgeführt. Um Motivationsverlusten durch eine vorzeitige Sättigung während der 3 x 24 h dauernden Testsitzungen vorzubeugen, wurden testadäquate Hebeldrücke nur während der Hellphasen belohnt. Der Vergleich der Hebeldruckzahlen während der Hell- und Dunkelphasen bot somit ein gutes Kriterium zur Beurteilung der Adaptationsfähigkeit der ursprünglich nacht-aktiven Tiere an geänderte Umgebungsbedingungen.

3.7 Auswertung

Für die statistische Auswertung der Versuchsdaten konnte auf im Institut vorhandene Programme (Matthes et al., 1982) zurückgegriffen werden. Sie wurden den aktuellen Versuchsbedingungen angepaßt und für unsere Auswertungen weiterentwickelt. Dazu stand ein Mikrocomputer (Commodore 4032) zur Verfügung. Zwischenergebnisse wurden über einen Drucker (Epson FX-80) ausgegeben. Die zusammengefaßten Ergebnisse wurden mit einem Plotter (Graphtec Modell MP 1000) graphisch dargestellt. Die Auswertung orientierte sich an den (quasi-statischen) Endergebnissen jedes Testschritts, an den Testverläufen und den Verteilungsmustern der Inter-Response- Intervall-Klassen. Auf die Berechnung der Lernleistung bei den verschiedenen Testprogrammen wird im Ergebnisteil näher eingegangen.

3.7.1 Statistische Auswertung

Zur statistischen Überprüfung der Versuchsergebnisse auf ihre Signifikanz wurde ein Differenztest für Mittelwerte von Normalverteilungen gewählt (Dürr und Mayer, 1981). Die Versuchstiere wurden aus einer Grundgesamtheit von 50 Tieren nach Gewichtskriterien ausgewählt und daraus wiederum 4 Versuchsgruppen zu je 10 Tieren nach dem Zufallszahlenprinzip gebildet. Die Versuchstiergruppen konnten somit als unabhängige Stichproben (Stichprobenumfang $n = 10$) angesehen werden, da die Tiere aus verschiedenen Würfen stammten und auch die Gruppenzuteilung, wie bereits erwähnt, zufällig erfolgte.

Um die Leistungsunterschiede der 4 Versuchsgruppen in den verschiedenen Teststufen auf ihre Signifikanz zu überprüfen, wurden die durchschnittlichen Leistungen der drei mit

Methylquecksilberchlorid belasteten Gruppen jeweils mit der mittleren Leistung der Kontrollgruppe verglichen. Dabei wird die Nullhypothese $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ gegen die Alternativhypothese $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$ getestet.

Die Versuchsergebnisse sollten auf einem Signifikanzniveau von 95% bzw. 99% überprüft werden. Aus Arbeitstabellen kann der entsprechende Wert z bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von 0.05 bzw. 0.01 entnommen werden.

Die Berechnungen bei der Testdurchführung erfolgten in drei Schritten:

1. Ermittlung der Tabellenwerte z für $1-\alpha$.
2. Berechnung der Annahmegrenzen c_u und c_o mit folgenden Formeln.

$$c_u = -z \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}} \quad c_o = z \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

3. Berechnung der Mittelwerte $\bar{x}$ und $\bar{y}$ der beiden Stichproben und Vergleich der Mittelwertdifferenz $\bar{x}-\bar{y}$ mit dem Annahmebereich.

$$c_u \leq \bar{x}-\bar{y} \leq c_o$$

Liegt die Differenz $\bar{x}-\bar{y}$ innerhalb des Annahmebereichs, so gilt die Nullhypothese $H_0 : \mu_1 = \mu_2$.

Fällt $\bar{x}-\bar{y}$ jedoch in den Ablehnungsbereich, so gilt die Alternativhypothese $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$.

In diesem Falle ist der Unterschied der Lernleistungen zwischen der Kontroll- und der jeweiligen Behandlungsgruppe mit der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bzw 1% statistisch gesichert.

Verwendete Zeichen:

n_1 = Stichprobenumfang der Kontrollgruppe
 n_2 = " " Behandlungsgruppe
 $\bar{x}$ = Durchschnittliche Leistung der Kontrollgruppe
 $\bar{y}$ = " " " " Behandlungsgruppe
 G_1^2 = Varianz der Kontrollgruppe
 G_2^2 = " " jeweiligen Behandlungsgruppe
 α = Irrtumswahrscheinlichkeit
 z = Tabellenwert für $1-\alpha$
 C_u = Untere Annahmegrenze
 C_o = Obere " "
 H_0 u. H_1 = Arbeitshypothesen
 μ_1 u. μ_2 = Stichprobenmittelwerte für normalverteilte
Grundgesamtheiten.

3.8 Stoffwechselversuche und Restmengenbestimmungen

Um einen Überblick über die aktuelle Aufnahme des Quecksilbers und dessen Ausscheidung zu gewinnen, wurden unmittelbar nach Beendigung der Verhaltenstestung an drei Tieren aus jeder Dosisgruppe Stoffwechselversuche durchgeführt. Die Auswahl der Tiere erfolgte zufällig. Für die Untersuchung standen drei Stoffwechselkäfige zur Verfügung. Die zeitliche Eingliederung dieser Zusatzuntersuchung ist aus Tab. 1 ersichtlich.

Folgende Parameter wurden dabei registriert:

Gewichtsentwicklung
Futtermittelverbrauch
Trinkwasserverbrauch sowie
Kot- und Urinmengen

Die Kot- und Urinproben der drei Versuchstiere jeder Dosisgruppe wurden im Labor von Herrn Dr. P. Schramel (Physikalisch-Technische Abteilung des Instituts für Angewandte Physik, GSF) mit dem Verfahren der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) auf ihren Quecksilbergehalt untersucht.

3.9 Histologische Untersuchungen

Im Anschluß an die Stoffwechseluntersuchungen wurde noch bei einigen Tieren aus jeder Versuchsgruppe eine Untersuchung des Gehirns auf morphologische Veränderungen vorgenommen. Hierzu wurden erneut drei zufällig ausgewählten Tieren aus jeder Gruppe die Gehirne entnommen. Eine Gehirnhälfte wurde für die lichtmikroskopische und die andere für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung präpariert. Im einzelnen wurde folgendermaßen verfahren:

Die Tiere wurden mit Äther betäubt und nach der Perfusionsmethode entblutet. Dabei wurden nach Freilegung des Herzens der rechte Vorhofs eröffnet und in die linke Hauptkammer erst physiologische Kochsalzlösung und anschließend Fixationslösung gespritzt. Um eine völlige Entblutung der Hirngefäße zu erreichen, sollte bei diesem Vorgehen anfangs noch Herztätigkeit vorhanden sein. Anschließend wurden die Gehirne freigelegt und auf makroskopisch sichtbare Veränderungen untersucht. Die entnommenen Gehirne wurden in die zwei Hirnhemisphären getrennt und für die licht- und rasterelektronenmikroskopische (REM) Beurteilung entsprechend präpariert.

Für die lichtmikroskopische Untersuchung wurden die Präparate mit Formalinlösung (4%) fixiert, anschließend gewässert, in einer Alkoholreihe mit ansteigenden Konzentrationen entwässert, mit Benzol alkoholfrei gemacht, in der Frontalebene geschnitten und in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden Serienschnitte in der Frontalebene angelegt. Nach Entfernen des Paraffins wurden die Schnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit dem Lichtmikroskop.

Zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Gehirnhälften durch Frontalschnitte in Scheiben zerlegt und anschließend eine Woche in einer gepufferten Glutaraldehyd-

lösung fixiert. Danach wurden die Proben in Aqua bidest. einige Stunden gewässert. In einer ansteigenden Alkohol- und Amylacetatreihe (50, 70, 80, 90, 96, 100 % jeweils 10 Minuten) wurden die Proben entwässert und in einem Trocknungsapparat (Critical Point Anlage, Bomar SPC-900 EX) eine Nacht mit flüssigem Kohlendioxid getrocknet. Die einzelnen Gehirnscheiben wurden mit Leitsilber auf kleinen Metallunterlagen befestigt und in einer Sputteranlage thermisch mit Gold beschichtet. Für die Auswertung der Präparate stand ein Stereoscan (Cambridge S 410) im Labor von Dr. U. Heinzmann, Abteilung für Nuklearbiologie (Leitung: Prof. Dr. habil Kriegel) des Instituts für Biologie der GSF zur Verfügung.

Zusätzlich wurden auch diesen Tieren noch Leber und Nieren entnommen und ebenfalls auf Restmengen von Quecksilber in der Physikalisch- Technischen Abteilung des Instituts für Angewandte Physik, GSF, untersucht.

4. Ergebnisse

4.1 Gewichtsentwicklung der Versuchstiere während der Behandlung

Während des Behandlungszeitraums wurden die gesundheitliche Überwachung der Tiere besonders sorgfältig durchgeführt und dazu auch die Gewichtsentwicklung herangezogen. Durch die zeitliche Staffelung der Verhaltenstestung mußte sich auch die Behandlung aller Versuchstiere über einen Zeitraum von vier Wochen erstrecken. Der Behandlungszeitraum für die einzelne Dosisgruppe betrug zehn Tage. Vor Beginn und nach Behandlungsende wurden die Tiere gewogen. Wegen des Altersunterschiedes der Versuchstiere von bis zu vier Wochen bei Behandlungsbeginn wurde auf die Darstellung der absoluten Gewichtswerte zugunsten der jeweiligen Veränderungen verzichtet. Diese sind für jede Dosisgruppe aus Abb. 1 ersichtlich.

Die Gewichtszunahmen der Tiere während des Behandlungszeitraums weisen bei den vier Dosisgruppen (Kontrolle, 0.05, 0.5 bzw. 2.0 mg) deutliche Unterschiede auf. Je höher die MMC-Dosis, desto geringer waren die Gewichtszunahmen. Der Unterschied der Gruppenmittelwerte zwischen der Kontrollgruppe und der höchsten Dosisgruppe beträgt 60%. Die prozentualen Gewichtszunahmen der vier Dosisgruppen liegen bei 5.3, 4.0, 3.7 und 3.3% (Abb. 1). Bei keinem der Tiere aus den vier Versuchsgruppen kam es zu einer Gewichtsabnahme während des Behandlungszeitraums.

Während und nach der Behandlung konnten bei den Tieren aus allen vier Gruppen keine äußerlich sichtbaren Veränderungen oder Verhaltensauffälligkeiten festgestellt werden.

9 GEWICHTS VERÄNDERUNG DER TIERE



Abb. 1 A = Kontrolle
 B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG
 C = 10 x 0.5 " "
 D = 10 x 2.0 " "

Durchschnittliche Gewichtszunahmen der Testgruppen während der 10- täglichen Behandlung.

Die Säulenhöhe entspricht der Gewichtszunahme in Gramm

↑ = Standardabweichung

Zur statistischen Auswertung s. im übrigen Kap. 4.4 bzw. 4.10.

4.2 Bestärkungsschema: "Differential Reinforcement of High Rate" (DRH) -Tests

4.2.1 Berechnung der DRH- Lernleistung

Bei der Messung des operanten Lernverhaltens der Ratten mit dem Konditionierungsverfahren DRH ist die Höhe des Aktivitätspotentials der Tiere von besonderer Bedeutung. Die Lernfähigkeit der Versuchstiere wurde mit zwei DRH-Konditionierungsschritten oder -stufen getestet. In zwei jeweils dreitägigen Testsitzungen mußten sich die Tiere an folgende DRH Testaufgaben gewöhnen (Siehe auch 3.6.2):

1. Testsitzung: DRH 2/1 (2 Hebeldrücke / 1 Sekunde)
2. Testsitzung: DRH 4/2 (4 " / 2 Sekunden)

Die Berechnung der Lernleistung in beiden DRH-Testsitzungen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{DRH-Leistung in (\%)} = \frac{a \times c \times 100}{b}$$

a = Anzahl der Belohnungen

b = Anzahl der Hebeldrücke während der Hellphasen

c = Anzahl der geforderten Hebeldrücke für eine Belohnung

Mit dieser Formel wurden für jedes Gruppenmitglied die prozentuale Lernleistung errechnet und aus den zehn Einzelwerten dann die Gruppenmittelwerte gebildet. Zur Berechnung der Lernleistungen standen verschiedene Auswertprogramme zur Verfügung. Dabei konnten die jeweils drei Tage dauernden Versuchssitzungen in beliebige zeitliche Auswertungsintervalle eingeteilt werden. Berechnet wurden die Gesamtleistung der Tiere über drei Tage, die einzelnen Tageslei-

stungen und die Lernleistungen für jeden 90-min Zyklus einer Hell- Dunkelphase.

4.2.2 DRH 2/1- Lernleistung und Gewichtsveränderung

In Abb. 2 sind die DRH 2/1- Lernleistungen der vier Dosisgruppen als Lernleistungskurven dargestellt. Nach jedem 90 min Durchgang wurde die prozentuale Gruppenleistung berechnet und über die 72 Std. Versuchsdauer aufsummiert. Die Endwerte der Kurven stellen zugleich die Gesamtleistung der Tiere während der dreitägigen Versuchssitzung dar. Die Lernleistungszunahme wird durch die Steigung der Kurven dokumentiert.

Die Lernleistungskurven der vier Dosisgruppen zeigen beträchtliche Verlaufsunterschiede, wobei besonders die Leistungskurve der Dosisgruppe D gegenüber den anderen Gruppen deutlich niedriger verläuft. Die Werte der Gruppe B liegen von Beginn der Versuchssitzung an höher als die der übrigen Versuchsgruppen. Den größten Abstand weist diese Lernleistungskurve zu den übrigen Kurven am Ende des ersten Tages, also nach 24 Std. Versuchsdauer auf. Mit zunehmender Testdauer wird der Abstand zwischen den Kurven der Gruppen A und C kleiner. Die Steigung der Leistungskurve der höchsten Dosisgruppe ist am zweiten und dritten Tag der Testsitzung deutlich geringer als bei den übrigen Gruppen. Die am Ende der Testsitzung erreichten Leistungsniveaus differieren bis zu 25%. Der Leistungsendwert der höchsten Dosisgruppe liegt 12 % unter dem Wert der Kontrollgruppe.

Noch deutlicher werden dosisabhängige Leistungsunterschiede, wenn man die Leistung der einzelnen Gruppen für die drei einzelnen Tage getrennt betrachtet (Abb. 3). Die Leistungsverbesserungen während der einzelnen Testsitzungen und die Tagesleistungen der höchsten Dosisgruppe fallen

deutlich geringer aus als die der restlichen Versuchsgruppen. Die Tendenz der Gewichtsveränderungen der Tiere während der 3-tägigen Testsitzung stimmte mit derjenigen der Lernleistungen der einzelnen Dosisgruppen überein. Abb. 4 a zeigt die Gewichtsabnahmen, wobei die Tiere der am stärksten exponierten Gruppe den höchsten durchschnittlichen Gewichtsverlust aufwiesen.

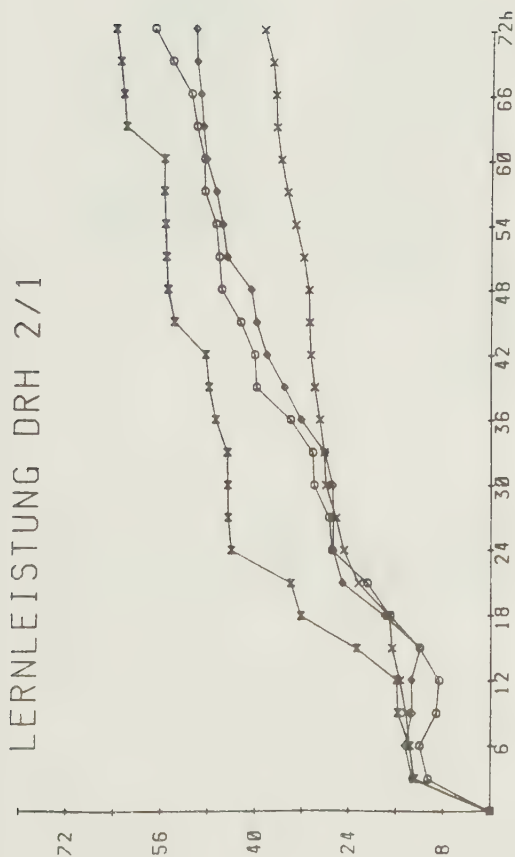


Abb. 2 ♦ - A = Kontrolle

× - B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG

○ - C = 10 x 0.5 "

× - D = 10 x 2.0 "

Durchschnittliche Lernleistung der Testgruppen während der DRH 2/1- Testsitzung.
 Abszisse: Testdauer in Stunden Ordinate: Lernleistung in %.

Die Berechnung der Leistung erfolgte mit der unter 4.2.1 angegebenen Formel.
 Die Kurvenendwerte stellen die Leistung der einzelnen Dosigruppen am Ende der 3- täglichen Testsitzung dar.

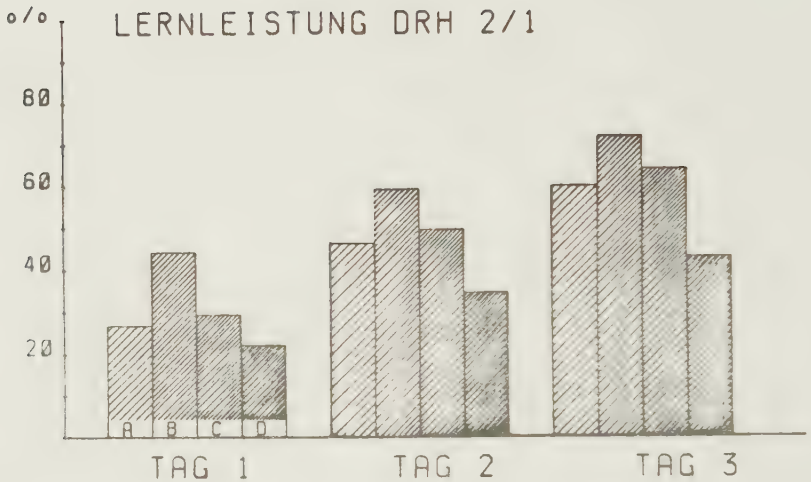


Abb. 3 A = Kontrolle
B = $10 \times 0.05 \text{ mg MeHgCl} / \text{kg KG}$
C = 10×0.5 " "
D = 10×2.0 " "

Durchschnittliche Lernleistung der Testgruppen an den drei einzelnen Tagen der DRH 2/1- Testsitzung.
Die Säulenhöhe entspricht der durchschnittlichen Gruppenlernleistung in %.

GEWICHTS VERÄNDERUNGEN

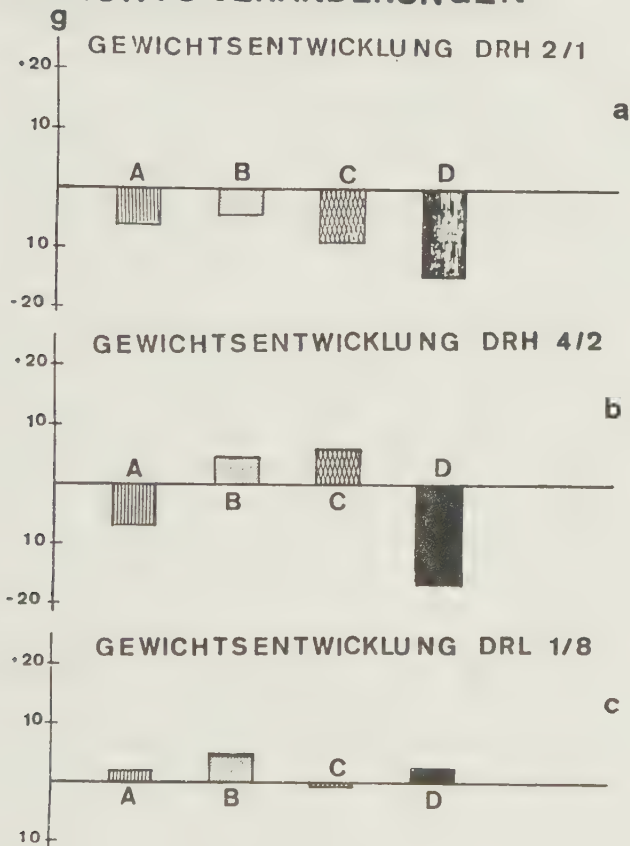


Abb. 4

A = Kontrolle

B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG

C = 10 x 0.5 " "

D = 10 x 2.0 " "

Durchschnittliche Gewichtsveränderungen der Testgruppen während der jeweils 3- täglichen DRH 2/1-, DRH 4/2- bzw DRL 1/8- Testsitzungen.

Die Säulenhöhen entsprechen den durchschnittlichen Gewichtszunahmen bzw -abnahmen in Gramm.

4.2.3 DRH 4/2- Lernleistung und Gewichtsveränderung

Auch beim DRH 4/2- Testschema wurde nach der DRH- Formel (siehe 4.2.1) die Lernleistung für jedes Tier berechnet. Zur Dokumentierung der weiteren Verhaltensleistungen in diesem Test wurden dieselben Darstellungsformen gewählt wie beim früheren DRH 2/1- Testprogramm. In Abb. 5 sind die Lernleistungen für die DRH- 4/2 Lernstufe gemäß Abb. 2 dargestellt.

Trotz der gestiegenen Lernanforderungen erreichten alle Dosisgruppen bei der DRH 4/2- Lernstufe eine bessere Lernleistung als bei der DRH 2/1- Lernstufe. Auch das Einsetzen der Leistungskurven auf einem relativ hohen Niveau steht im Gegensatz zum DRH 2/1- Programm. Hierin dokumentiert sich der "Trainingseffekt" der DRH 2/1- Testsitzung für die Tiere. Die Lage der Lernleistungskurven der einzelnen Dosisgruppen zueinander stimmt weitgehend mit der der DRH 2/1- Teststufe überein. Die Anfangswerte der DRH 4/2- Lernleistungskurve liegen auf demselben Niveau wie die Leistungsendwerte bei der DRH 2/1- Testsitzung. Die Leistungszunahmen während der 72 Std. Versuchsdauer, die durch die jeweilige Steigung der Kurven dokumentiert werden, sind deutlich geringer als bei der DRH 2/1- Lernstufe. Bei der höchsten Dosisgruppe ist die erreichte Leistungsverbesserung erneut deutlich geringer als bei den anderen Versuchsgruppen. Auch das insgesamt erreichte Leistungsniveau liegt bei dieser Gruppe deutlich tiefer als dasjenige der restlichen Dosisgruppen. Die Endwerte der Kurven stellen wiederum die Leistung der Tiere am Schluß der 3-tägigen DRH 4/2- Sitzung dar. Dabei beträgt der Leistungsunterschied zwischen der Kontrollgruppe und der höchsten Substanzgruppe 13%.

Auch bei der Darstellung der einzelnen Tagesleistungen in dieser Lernstufe (Abb. 6) lassen sich deutliche Leistungsunterschiede zwischen den Gruppen erkennen. Die 0.05

und 0.5 Gruppen haben nahezu identische hohe Leistungsniveaus am zweiten (73%) und dritten (78 %) Tag erreicht. An diesen Tagen besteht aber auch zwischen diesen beiden Gruppen und der höchsten Dosisgruppe ein besonders ausgeprägter Leistungsunterschied. Der Abstand zwischen der Kontrollgruppe und der am stärksten belasteten (2.0 mg) Gruppe beträgt am dritten Testtag nahezu 20%.

Diese Unterschiede kommen auch in der Gewichtsentwicklung während der Testsitzungen zum Ausdruck. Entgegen dem Anschein müssen Gewichtsentwicklung und Leistung der Tiere nicht eng miteinander korreliert sein, da den Tieren ausreichend lange Zeitintervalle zur Verfügung standen, um auch bei geringer spezifischer Testleistung eine hinreichende Anzahl von Futterbelohnungen zu erhalten. Manche Tiere verschafften sich während einer einzigen Hellphase so viele Futterbelohnungen, daß sie dann die nachfolgenden Hellphasen völlig ungenutzt verstreichen ließen. In Abb. 4 b sind die Gewichtsveränderungen während der Testsitzung für die Versuchsgruppen dargestellt. Die 0.05 und 0.5 Gruppen zeigten eine Gewichtszunahme; die Kontroll- und die 2.0 Gruppe nahmen dagegen während der Testsitzung ab. Die Gewichtsabnahme der 2.0 Gruppe war im Mittel um 10,6 g stärker ausgeprägt als diejenige der Kontrollgruppe.

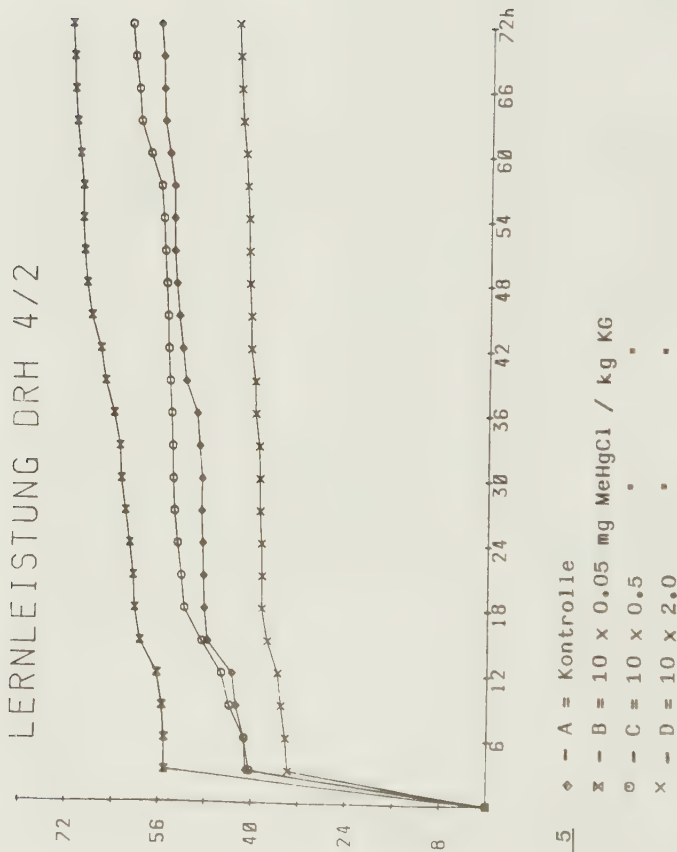


Abb. 5

♦ - A = Kontrolle

■ - B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG

○ - C = 10 x 0.5 mg MeHgCl / kg KG

× - D = 10 x 2.0 mg MeHgCl / kg KG

Durchschnittliche Lernleistung der Testgruppen während der DRH 4/2- Testsitzung.
 Abszisse: Testdauer in Stunden Ordinate: Lernleistung in %.
 Die Berechnung der Leistung erfolgte mit der unter 4.2.1 angegebenen Formel.
 Die Kurvenendwerte stellen die Leistung der einzelnen Dosisgruppen am Ende der 3- tägigen Testsitzung dar.

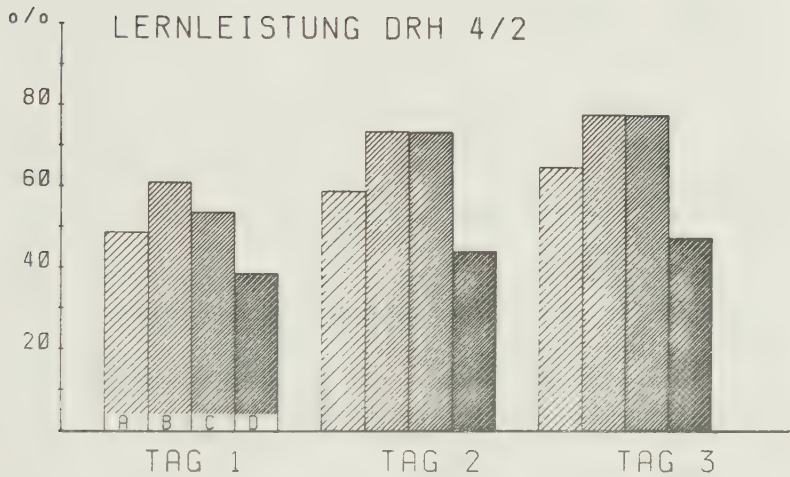


Abb. 6 A = Kontrolle
 B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG
 C = 10 x 0.5 " "
 D = 10 x 2.0 " "

Durchschnittliche Lernleistungen der Testgruppen an den drei einzelnen Tagen der DRH 4/2- Testsitzung.

Die Säulenhöhe entspricht der durchschnittlichen Gruppenlernleistung in %.

4.3 Bestärkungsschema: "Differential Reinforcement of Low Rate" (DRL) - Test

4.3.1 Berechnung der DRL - Lernleistung

Im Gegensatz zu den zwei vorhergehenden DRH- Testverfahren ist beim DRL- Testschema das Aktivitätspotential der Tiere von untergeordneter Bedeutung, da nicht die Schnelligkeit beim Hebeldrücken im Vordergrund steht, sondern das Einhalten von Pausen zwischen den Hebeldrücken gefordert wird. Da dieses Testschema geringe Verhaltenshäufigkeiten bestärkt, ist eine reduzierte Aktivität zum Erreichen einer guten Testleistung vorteilhaft.

Die Verhaltensleistung jedes einzelnen Tieres beim DRL 1/8- Test wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{DRL - Leistung (\%)} = \frac{a \times 100}{b}$$

Dabei sind: a = Anzahl der Belohnungen

b = Anzahl der Hebeldrücke während der
Hellphasen

Die Länge des Pausenintervalls von 8 Sekunden bleibt bei der Berechnung der DRL- Leistung unberücksichtigt, da nur Hebeldrücke außerhalb des Warteintervalls belohnt werden.

4.3.2 DRL 1/8- Lernleistung und Gewichtsveränderung

Zur Dokumentierung der DRL- Leistung wurde die gleiche Darstellungsart gewählt wie bei den DRH- Tests. Die Leistungskurven der verschiedenen Gruppen in diesem Test (Abb. 7) verlaufen nahezu parallel und auf gleichem Niveau. Die Tiere der höchsten Dosisgruppe weisen eine geringfügig bessere Leistung auf als die der anderen Dosisgruppen. Auch bei der

tageweisen Darstellung der spezifischen DRL 1/8- Lernleistung (Abb. 8) kommt die Ausgeglichenheit der Leistung der Dosisgruppen (K; 0.05; 0.5) zum Ausdruck. Diese drei Testgruppen erreichten an den einzelnen Tagen nahezu identische Leistungswerte. Die Gruppenmittelwerte waren 35% am ersten, 56% am zweiten und 65% am dritten Tag. An allen drei Tagen liegt die 2.0 Gruppe in ihrer Leistung über den restlichen Gruppen.

Die Gewichtsentwicklung der Ratten während der DRL- Test-sitzungen ist aus Abb. 4 c ersichtlich. Die jeweiligen Gewichtsveränderungen waren bei diesem Testprogramm nur gering. Die prozentuale Veränderung des Körpergewichts betrug maximal 1% und zeigte keine Dosisabhängigkeit.

LERNLEISTUNG DRL 1/8

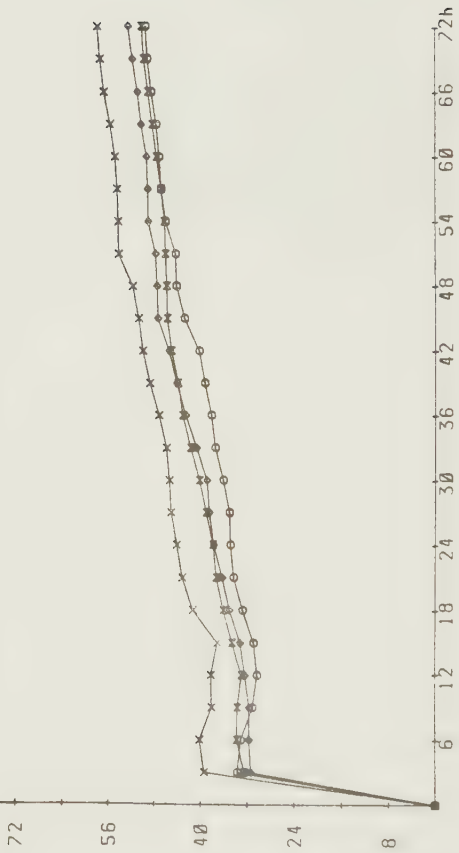


Abb. 7 ♦ - A = Kontrolle

× - B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG

○ - C = 10 x 0.5

× - D = 10 x 2.0

Durchschnittliche Lernleistung der Testgruppen während der DRL 1/8- Testsitzung.
Abszisse: Testdauer in Stunden Ordinate: Lernleistung in %.
Die Berechnung der Leistung erfolgte mit der unter 4.3.1 angegebenen Formel.
Die Kurvenendwerte stellen die Leistung der einzelnen Dosisgruppen am Ende der 3- täglichen Testsitzung dar.

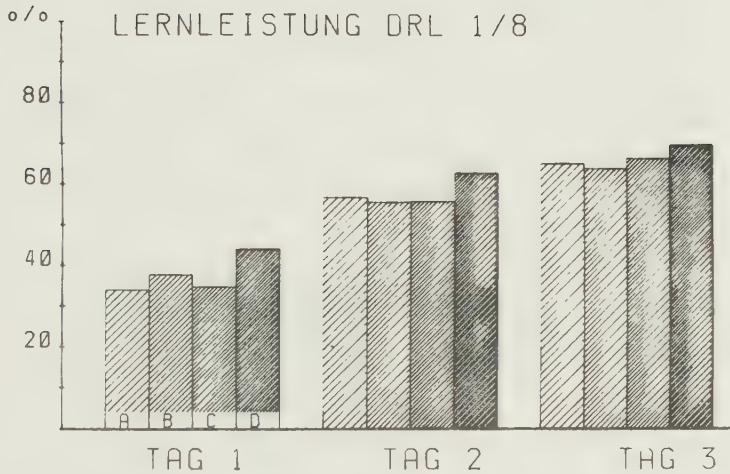


Abb. 8 A = Kontrolle
 B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG
 C = 10 x 0.5 " "
 D = 10 x 2.0 " "

Durchschnittliche Lernleistungen der Testgruppen an den drei einzelnen Tagen der DRL 1/8- Testsitzung.
Die Säulenhöhe entspricht der durchschnittlichen Gruppenlernleistung in %.

4.4 Gesamtdarstellung der Lernleistungen während der verschiedenen Testprogramme

Um die Vielzahl der Ergebnisse besser miteinander vergleichen zu können, wurde in Abb. 9 der Versuch gemacht, die durchschnittlichen Gruppenleistungen in den einzelnen Tests gemeinsam abzubilden. Hierzu wurden jeweils die Ergebnisse am Ende der 3-tägigen Verhaltenstests herangezogen. Das Nebeneinanderstellen der DRH- und DRL- Gesamtleistungen bei den einzelnen Dosisgruppen bietet die Möglichkeit, Trends und Leistungsverläufe in den unterschiedlichen Programmen besser als in Einzelauswertungen erkennen zu können.

Abb. 9 zeigt die nahezu identischen, dosisabhängigen Leistungsverläufe bei den beiden DRH- Testprogrammen. Die angegebenen mittleren Fehler dokumentieren die Leistungsunterschiede der Tiere innerhalb einer Dosisgruppe. Dabei sind die individuellen Leistungsunterschiede in der Kontroll- und der am höchsten belasteten Gruppe besonders ausgeprägt.

Beim DRL- Testprogramm sind nur geringfügige Leistungsunterschiede zwischen den Dosisgruppen vorhanden. Die einzelnen Gruppen wirken auf Grund ihrer Einzelleistungen in diesem Testverfahren insgesamt homogener.

Nur die 2.0 Gruppe erreichte in ihrer DRL- Leistung einen höheren Wert als bei den DRH-Testsitzungen.

LERNLEISTUNG DER VERSUCHSTIERE
Darstellung der Gesamtleistung ueber 3 Tage

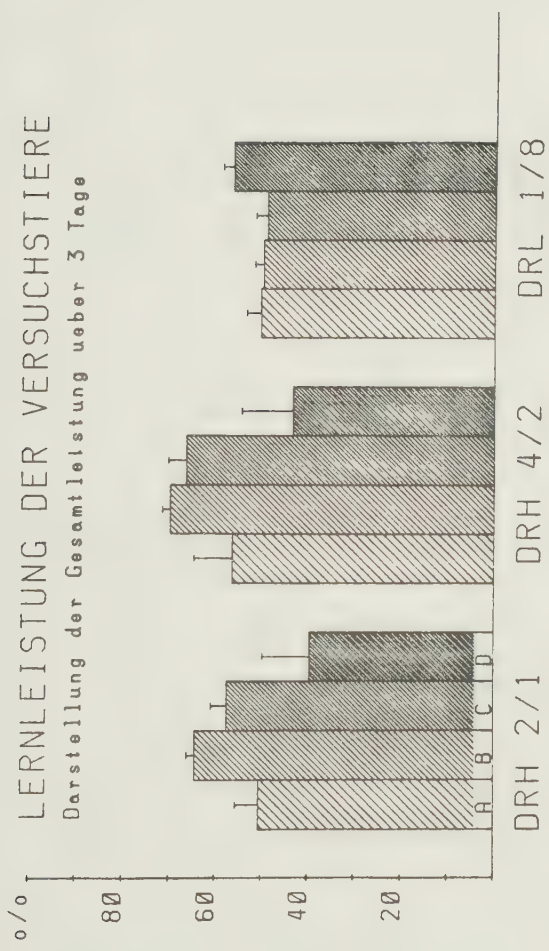


Abb. 9 A = Kontrolle
B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG
C = 10 x 0.5
D = 10 x 2.0

Durchschnittliche Testleistungen ueber 3 Tage für die verschiedenen Dosisgruppen in den einzelnen Programmschritten. Die Säulenhöhe entspricht dem Durchschnittswert einer Dosisgruppe. Die Berechnung der Leistung erfolgte mit den unter 4.2.1 und 4.3.1 angegebenen Formeln.
T = mittlerer Fehler

4.5 Hell- Dunkel- Diskriminierung

Zur Aufrechterhaltung einer stetigen Motivationshöhe waren alle 3 x 24 Std dauernden Testsitzungen in einander abwechselnde Hell-Dunkel- Perioden eingeteilt. Belohnungen erfolgten grundsätzlich nur für Hebeldrücke während der 30 min Hellphasen. Hebeldrücke während der 60 min Dunkelphasen blieben auch dann unbelohnt, wenn sie den jeweiligen Testanforderungen entsprachen. Diese zusätzliche über alle Teststufen hinweg gleichbleibende Lernanforderung war bei allen Versuchssitzungen gegeben. Die Berechnung der prozentualen Hell-Dunkel-Diskriminationsleistung der Tiere erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Diskriminierung in \%} = \frac{a \times 100}{b}$$

a = Anzahl der Hebeldrücke pro Dunkelphase

b = Anzahl der Hebeldrücke pro Hellphase

Die Diskriminationsleistungen wurden für jedes Tier einzeln berechnet und daraus Mittelwerte für jede Dosisgruppe gebildet. Die Säulenhöhen in Abb. 10 entsprechen den prozentualen Diskriminationsleistungen der jeweiligen Dosisgruppen. Die Abbildungen (10a - 10c) zeigen die entsprechenden Leistungen der verschiedenen Dosisgruppen an den drei einzelnen Tagen des jeweiligen Testprogramms. Je kleiner dieser Wert, desto besser war die Anpassung an die gleichbleibende Testanforderung. Mit zunehmender Testdauer waren eine Abnahme der Hebeldruckrate im Dunkeln und damit eine Verbesserung der Diskriminationsleistung zu erwarten.

Dies kommt in den drei Diagrammen deutlich zum Ausdruck. Anpassungs- und damit Diskriminationsleistungsunterschiede können bei dieser relativ einfachen Anforderung am ehesten zu Beginn der Testsitzungen auftreten und damit Unterschiede in der Schnelligkeit der Anpassung offenlegen.

Aus Abb. 10 a ist die Diskriminationsleistung der Versuchsgruppen am ersten Tag des jeweiligen Testprogramms ersichtlich. Dabei erreicht die 2.0 Gruppe bei allen drei Testprogrammschritten jeweils die schlechteste Diskriminationsleistung. Am zweiten (Abb. 10b) und dritten (Abb. 10c) Tag der Testsitzungen sind keine dosisspezifischen Abweichungen in den Leistungen vorhanden.

Auch die Darstellung der Gesamtleistung über 3 Tage (Abb. 11) ergibt in den drei Testprogrammen keine dosisabhängigen Abweichungen. Gut zum Ausdruck kommt jedoch die stufenweise Abnahme der Säulenhöhe von links nach rechts und damit die kontinuierliche Leistungsverbesserung der Tiere mit zunehmender Testdauer. Bei der Betrachtung der erreichten Diskriminationsleistungen der Dosisgruppen über alle Versuchsitzungen fällt das generell hohe Leistungsniveau auf.

HELL - DUNKEL - DISKRIMINIERUNG

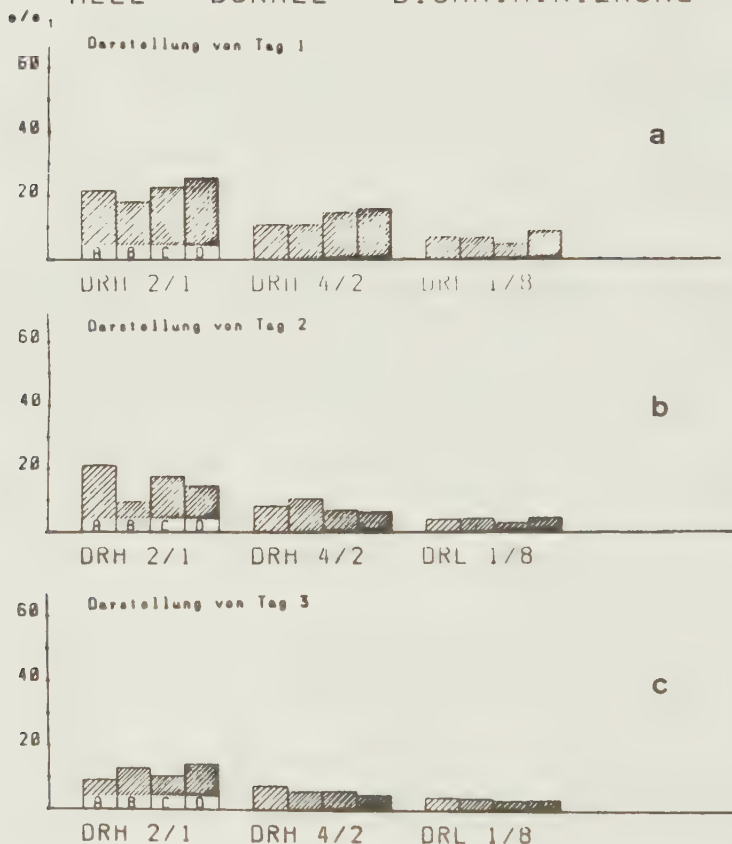


Abb. 10 HDD in % der Hebeldrücke in den Hellphasen (HDH)

A = Kontrolle

B = $10 \times 0.05 \text{ mg MeHgCl} / \text{kg KG}$

C = 10×0.5 " "

D = 10×2.0 " "

Prozentualer Anteil der "falschen" Hebeldrücke (HDD) während der Dunkelphasen an den einzelnen Testtagen in den unterschiedlichen Teststufen DRH 2/1, DRH 4/2 und DRL 1/8. Die Berechnung der Diskriminationsleistung erfolgte mit der unter 4.5 angegebenen Formel.

HELL - DUNKEL - DISKRIMINIERUNG

Darstellung der Gesamtleistung ueber 3 Tage

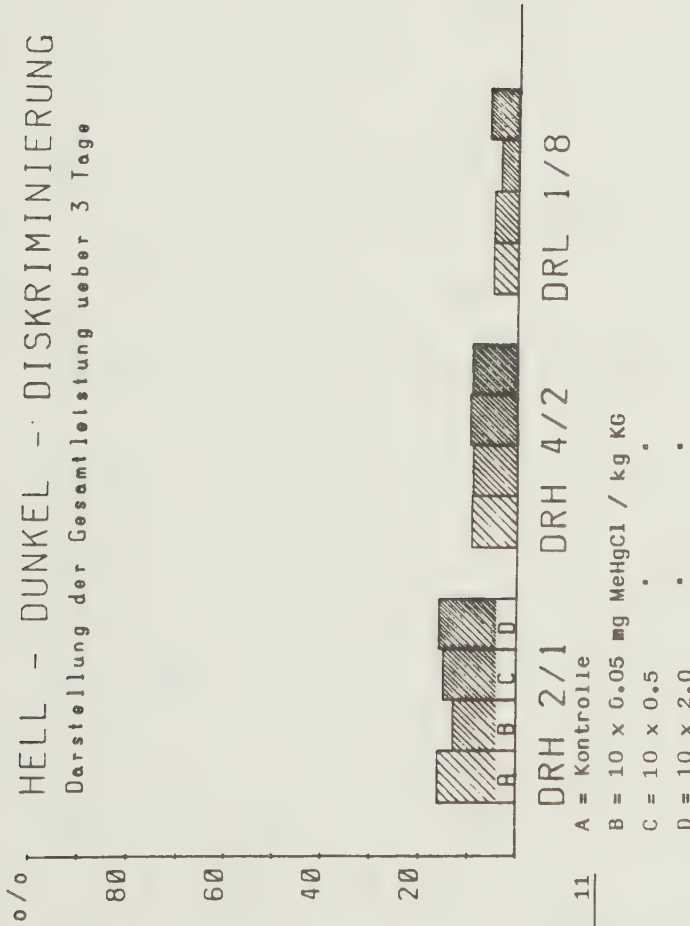


Abb. 11

A = Kontrolle

B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG

C = 10 x 0.5

D = 10 x 2.0

Prozentualer Anteil der "falschen" Hebelrücke (HDD) während der Dunkelphasen im Verlauf der 3- täglichen Testung mit den unterschiedlichen Teststufen DRH 2/1, DRH 4/2 und DRL 1/8. Die Berechnung der Diskriminationsleistung erfolgte mit der unter 4.5 angegebenen Formel.

4.6 Aktivitätsverlauf und circadianer Rhythmus

Alle Versuchstiere durchliefen drei aufeinander aufbauende bzw. sich ergänzende Verhaltenstestprogramme. Diese Programme stellten, wie bereits ausgeführt, unterschiedliche Ansprüche an die motorische Aktivität der Tiere. Beim DRH 4/2- Testschema ist eine hohe Aktivität besonders vorteilhaft zum Erreichen einer guten Leistung, da die Hebeldrücke schnell aufeinanderfolgen müssen, um eine Futterbelohnung zu erhalten. Durch erhöhte Aktivität können selbst dann Futterbelohnungen erreicht werden, wenn das Prinzip des Testprogramms von den Tieren nicht erkannt wird. Das hier angegebene Aktivitätsmaß stellt nicht die Gesamtaktivität des Tieres, wie sie im allgemeinen bei üblichen Motilitätsmessungen bestimmt wird, dar, sondern entspricht vielmehr der reinen Hebeldruckaktivität, wie sie im Zusammenhang mit dem jeweiligen Testprogramm von dem Tier gefordert wurde. Als Maß für die motorische Aktivität wurde die durchschnittliche Anzahl der Hebeldrücke der Testgruppen während der einzelnen 30 min Hellphasen (HDH/30 min) verwendet.

Als Beispiel hierfür ist in Abb. 12 der Aktivitätsverlauf der verschiedenen Dosisgruppen während der DRH 4/2- Testsitzung dargestellt. Auf der Abszisse sind die Tageszeiten für die 72 Stunden dauernden Testsitzungen angegeben. Die Aktivitätskurven weisen alle einen ausgeprägten circadianen Rhythmus auf. Die Maxima der Kurven liegen an den drei Tagen jeweils in den späten Abendstunden und die Minima in den frühen Nachmittagsstunden. In den Vormittagsstunden erreichen die Aktivitätskurven bei allen Dosisgruppen "Zwischenhochs", um dann am frühen Nachmittag nahezu auf Null abzufallen. Die höchsten Hebeldruckzahlen liegen bei allen Dosisgruppen am Beginn der Testsitzung - in der ersten Hellphase. Diese Aktivitätsschwankungen unterliegen bei allen Gruppen einheitlich, ohne tageszeitliche Verschiebung, einer deutlich ausgeprägten circadianen Rhythmik. Die

Gruppenunterschiede liegen jedoch in den jeweils erreichten Aktivitätshöhen. Die Kurve der höchsten Substanzgruppe liegt hier im unteren Bereich der Kurvenschar. In den Phasen der höchsten Tagesaktivität sind die Gruppenunterschiede am deutlichsten ausgeprägt. Dabei weist die höchste Dosisgruppe eine deutlich geringere Aktivität auf als die anderen Testgruppen.

Auf die Darstellung der Aktivitätsverläufe bei den DRH 2/1- und DRL 1/8- Testprogrammen wurde verzichtet, da sie eine ähnliche tageszeitliche Rhythmik aufwiesen, allerdings - programmbedingt - auf einem niedrigeren absoluten Niveau verliefen.

Um die Zusammenhänge und Abhängigkeiten zwischen Lernleistung und Aktivität in den unterschiedlichen Testprogrammen zu veranschaulichen, wurden in Tab. 2 Aktivität und Lernleistung zusammen dargestellt. Dabei werden die Lernleistungen für die einzelnen Testtage und die durchschnittlichen täglichen Hebeldrücke pro Hellphase während der drei Testprogramme gegenübergestellt. Bei den DRH- Tests ist die Aktivität positiv korreliert mit der Lernleistung. Die erreichte Leistung der Tiere ist umso höher, je höher die Aktivität ist. Beim DRL-Testprogramm weisen Leistung und Aktivität ebenfalls eine enge, allerdings reziproke Korrelation auf. Je geringer die Aktivität der Tiere, desto höher hier ihre Lernleistung.

Lernleistung und Aktivität

Dosisgr.	A		B		C		D	
	Leist. HDH in %		Leist. HDH in %		Leist. HDH in %		Leist. HDH in %	
	DRH 2/1- Testprogramm							
	26.7	48	44.2	59	29.3	34	21.7	30
	46.2	61	59.2	90	49.5	76	34.5	41
	59.8	77	71.9	91	64.0	98	43.0	61
	DRH 4/2- Testprogramm							
	48.6	180	61.0	223	53.6	225	38.6	120
	58.8	149	73.6	199	73.4	162	44.0	115
	64.8	124	77.9	171	77.8	162	47.4	103
	DRL 1/8- Testprogramm							
	34.0	77	37.8	87	34.8	92	44.1	74
	56.6	61	55.5	71	55.7	69	62.7	50
	65.1	51	63.9	50	66.5	51	69.9	47

Tabelle 2 : Lernleistung (Leist.) und Aktivität (HDH)
 Den durchschnittlichen Lernleistungen an den einzelnen Testtagen sind die durchschnittlichen tägl. Hebeldrücke pro Hebelphase während der drei Testprogramme gegenübergestellt. Aktivität und Lernleistung sind in den DRH- Tests positiv korreliert; Im DRL- Test liegt eine negative Korrelation vor.

AKTIVITÄT DER TIERE (DRH 4/2)

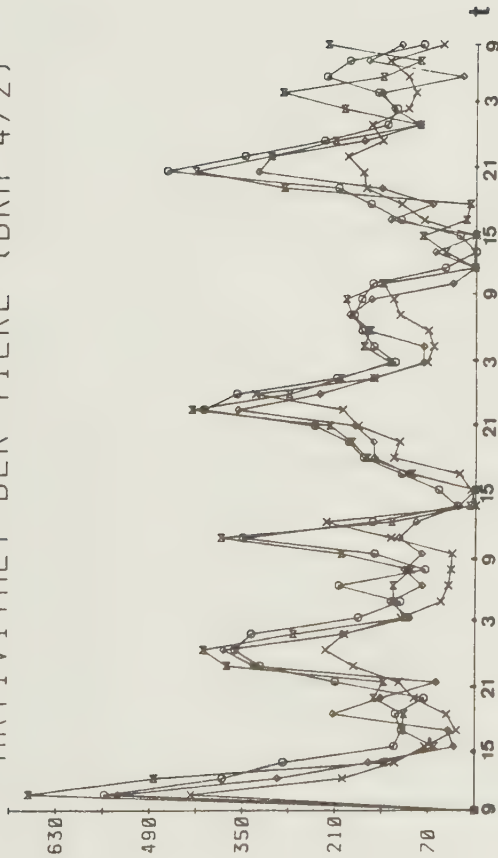


Abb. 12

♦ - A = Kontrolle

× - B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG

○ - C = 10 x 0.5

x - D = 10 x 2.0

Circadianer Aktivitätsrhythmus der Testgruppen während der DRH 4/2- Testsituzung. Als Maß für die Aktivität sind die durchschnittlichen Hebeldrücke einer Gruppe während der 30 min Hellphasen (HDH/30 min) angegeben. Abszisse: Tageszeit in Stunden Ordinate: Hebeldrücke während der einzelnen Hellphasen (HDH)

4.7 Gewichtsentwicklung während der gesamten Versuchsdauer

Die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere wurde über einen Zeitraum von 5 Monaten registriert. Die erste Wägung wurde bei der Versuchsgruppenbildung in einem Alter von knapp 4 Monaten durchgeführt. Nach Beendigung der Verhaltenstests und der daran anschließenden Stoffwechselversuche erfolgte im Alter von 9 Monaten eine Abschlußwägung aller Tiere. Danach wurden einigen zufällig ausgewählten Tieren der Versuchsgruppen die Gehirne für histologische Untersuchungen sowie Organe (Leber und Niere) für Restmengenbestimmungen von Quecksilber entnommen. Die Gewichtsveränderungen während der 5-monatigen Versuchsdauer sind für jede Versuchsgruppe in Abb. 13 dargestellt.

Die Gewichtskurven für die einzelnen Dosisgruppen liegen relativ eng beieinander. Sie weisen insgesamt eine übereinstimmende Steigung auf, die anfänglich stärker ausgeprägt ist als im letzten Drittel der Kurven. Der Anfangswert und die folgenden Mittelwerte der B-Gruppe liegen höher als die Werte der übrigen Dosisgruppen. Die mittleren Gewichtswerte der D-Gruppe liegen deutlich darunter. Der kontinuierliche Anstieg der Gewichtskurven ist durch einzelne Abweichungen unterbrochen. Diese Abweichungen kommen durch die Gewichtsabnahme der Tiere während der einzelnen Testsitzungen zustande. Die Kurve der D-Gruppe weist dabei die deutlichsten Ausschläge auf. Aus allen Kurven ist ersichtlich, daß die Gewichtsabnahmen während der Verhaltenstestung eine Woche nach der jeweiligen Testsitzung bei allen Dosisgruppen wieder ausgeglichen waren.

g GEWICHTSENTWICKLUNG DER VERSUCHSTIERE

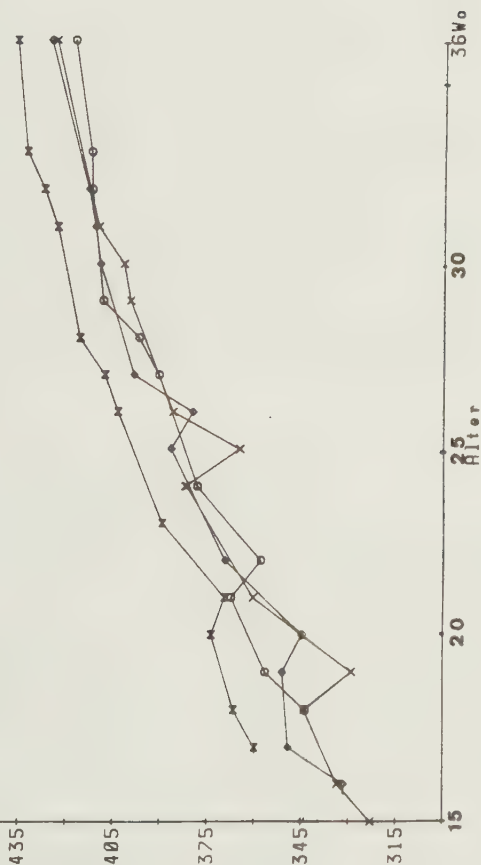


Abb. 13

- - A = Kontrolle
- x - B = 10 x 0.05 mg MeHgCl / kg KG
- o - C = 10 x 0.5 " "
- x - D = 10 x 2.0 " "

Gewichtsentwicklung der Versuchstiere über 21 Wochen vom Behandlungsbeginn bis zum Ende sämtlicher Versuche. Das Gewicht ist in Gramm angegeben und entspricht dem jeweiligen Gruppenmittelwert.
Abszisse: Alter der Tiere in Wochen

4.8 Stoffwechselversuche und Restmengenbestimmungen

4.8.1 Stoffwechselversuche

Nach Beendigung der Verhaltensuntersuchungen wurden Stoffwechselversuche durchgeführt. Zwischen Behandlungsende und diesen Versuchen lag ein Zeitraum von 3 Monaten. Hierzu wurden die Exkremente von drei Tieren jeder Dosisgruppe in Stoffwechselkäfigen gesammelt und mit dem Verfahren der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) auf ihren Quecksilbergehalt untersucht. Durch diese Versuche sollte ein Überblick über die aktuelle Ausscheidungssituation bei den verschiedenen Dosisgruppen gewonnen werden. Die biologische Halbwertszeit für die Elimination von Quecksilber beträgt bei Ratten ungefähr 16 Tage. Es sollte überprüft werden, ob nach 3 Monaten noch Ausscheidungsunterschiede bei den verschiedenen Dosisgruppen vorhanden sind.

In Tab. 3 sind die ermittelten Quecksilbergehalte (ppm) der Kot- und Urinproben für alle Dosisgruppen zusammengestellt. Wie aus der Tabelle 3 entnommen werden kann, sind auch drei Monate nach der Methylquecksilberapplikation bei den Ratten noch deutliche Ausscheidungsunterschiede vorhanden. Die Konzentrationen der Applikationslösungen verhielten sich wie 1 : 10 : 40. Diese Relation ist auch bei den Quecksilbergehalten der Kot- und Urinproben noch weitgehend gegeben. Kontrollen und die niedrigst exponierte Gruppe weisen nur geringe Unterschiede auf. Es muß angenommen werden, daß die Hg- Gehalte der Kontrollgruppe auf dem Hg- Gehalt des Trinkwassers und des Futters (Altrominstandarddiät, 0.02 ppm) beruhen. Bei der Futter- und Wasseraufnahme während der Versuche konnten jedoch keine Abweichungen zwischen den Gruppen festgestellt werden. Auch war die Gewichtsabnahme während des dreitägigen Aufenthalts im Stoffwechselkäfig bei allen Tieren weitgehend gleich.

Durchschnittliche Quecksilbergehalte der Kot- und Urinproben (ppm)

Dosisgruppe	A	B	C	D
Hg im Kot	0.11	0.11	0.64	4.1
Hg im Urin	0.26	0.07	0.39	1.6
Kotabsatz (g)	14	8	17	7
Urinabsatz (g)	9	13	10	8

Tab. 3: A = Kontrolle

B = 10 x 0,05 mg MeHgCl / kg KG

C = 10 x 0,5 " "

D = 10 x 2,0 " "

4.8.2 Restmengenbestimmungen

Im Anschluß an die Stoffwechselversuche wurden bei weiteren drei zufällig ausgewählten Tieren aus jeder Dosisgruppe die Leber und die Nieren für Restmengenbestimmungen, sowie die Gehirne für zusätzliche histologische Untersuchungen entnommen. Zwischen Behandlungsende und der Organentnahme lag nun bereits ein Zeitraum von vier Monaten. Wie auch bei den Stoffwechselversuchen, wurden die Quecksilbergehalte der entnommenen Organe mit dem Verfahren der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ermittelt. In Tabelle 4 sind die Quecksilbergehalte (ppm) von Leber und Nieren für die jeweiligen Dosisgruppen zusammengestellt.

Durchschnittliche Quecksilbergehalte von Leber und Nieren (ppm)

Dosisgruppe	A	B	C	D
Hg in Leber	0.04	0.09	0.9	3.4
Hg in Nieren	0.56	1.7	16.0	38.9

Tab. 4: A = Kontrolle
B = $10 \times 0,05 \text{ mg MeHgCl} / \text{kg KG}$
C = $10 \times 0,5$ " "
D = $10 \times 2,0$ " "

Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte dar, die aus jeweils 3 Einzelwerten gebildet wurden.

Wie aus Tabelle 4 entnommen werden kann, weisen die Nieren ungefähr eine 10-fach höhere Quecksilberkonzentration auf als die Leberpräparate. Diese Konzentrationsunterschiede sind sowohl bei den Substanzgruppen als auch bei der Kontrollgruppe vorhanden. Die Quecksilbergehalte der entnommenen Organe sind bei den Tieren aus den verschiedenen Dosisgruppen deutlich verschieden. Die festgestellten Konzentrationsunterschiede stimmen ziemlich exakt mit den Konzentrationsrelationen (1 : 10 : 40) der verwendeten Applikationslösungen überein.

4.9 Histologische Untersuchungen

Im Anschluß an die Hauptversuche wurden histologische Untersuchungen bei wiederum drei Tieren aus jeder Dosisgruppe vorgenommen. Lediglich die Gehirne sollten auf morphologische Veränderungen überprüft werden. Bei der Entnahme der Gehirne konnten makroskopisch keine Veränderungen festgestellt werden.

4.9.1 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Oberflächen der Gehirnventrikel und der Zustand des Plexus chorioideus untersucht. Die Gehirnventrikel sind von Ependymzellen, die einen dichten Zilienbesatz tragen, ausgekleidet. Abb. 14 zeigt einen Ausschnitt aus dem dritten Gehirnventrikel. Die Zilien der Ependymzellen liegen ungeordnet, büschelartig beieinander und erscheinen niedergedrückt. Die Ependymzellen mit ihrem Mikrovilliäbesatz selbst sind im Ziliengewirr nur an einigen Stellen zu erkennen. Bei den zur Verfügung stehenden Präparaten waren nur teilweise derartige Veränderungen vorhanden. Andererseits konnten aus präparationstechnischen Gründen einige Gehirnpräparate nicht ausgewertet werden. Die gefundenen Veränderungen und die geringe Anzahl der brauchbaren Präparate erlaubten keine Aussage über eine Dosisabhängigkeit.

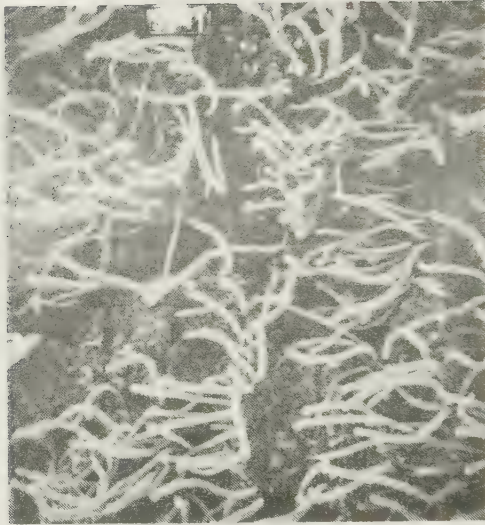


Abb. 14 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung von
Ependymzellen einer 7 Monate alten ♂ Ratte
Dritter Gehirnventrikel, Vergrößerung 3400

4.9.2 Lichtmikroskopie

Die Beurteilungskriterien bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate waren: Gehirnventrikelgröße, die Innenauskleidung der Ventrikel, Gehirnrindendicke und -oberfläche, Blutgefäße mit eventuellen Infiltraten und Strukturveränderungen, wie z.B. Indurationen des Gehirngewebes. Bei dieser Untersuchung konnten keinerlei Veränderungen der Gehirne festgestellt werden.

4.10 Statistische Auswertung

Die Lernleistungsunterschiede der verschiedenen Testgruppen wurden mit einem Differenztest für Mittelwerte von Normalverteilungen auf ihre Signifikanz überprüft. Berechnungsgrundlagen (Kap. 3.7).

Die in den Tabellen 5a - 5c angegebenen Mittelwerte $\bar{x}$ und $\bar{y}$ sowie die dazugehörigen Standardabweichungen σ_1 bzw. σ_2 , stellen die über drei Tage aufsummierten Lernleistungen bzw. Erfolgsquoten dar. Aus diesen Leistungsdaten wurden die statistischen Parameter für die jeweiligen Testgruppen errechnet und in Tabellen für die Bestärkungsschemata (Tab. 5a DRH 2/1, Tab. 5b DRH 4/2, Tab. 5c DRL 1/8) zusammengestellt.

Die am Ende der 3-tägigen Versuchssitzungen erreichten Leistungsdaten wurden für die Berechnungen herangezogen, weil diese Endwerte der Gesamtleistung der Testtiere während einer Versuchssitzung entsprechen. Auch sind große Leistungsschwankungen, wie sie meist am Beginn einer Testsitzung auftreten, bei deren Ende ausgeglichener und damit besser für eine statistische Bearbeitung geeignet. Die errechneten Werte beziehen sich auf ein Signifikanzniveau von 95%.

Tab. 5a: Statistische Auswertung Bestärkungsschema DRH 2/1

Behandl. gruppe	Mittel- werte	Standard- abweichung	Diff. $\bar{x}-\bar{y}$	Annahme- bereich	Sig.
Ko	$\bar{x} = 50.6$	22.7			
0.05	$\bar{y} = 64.3$	5.5	-13.9	± 14.5	n.s.
0.5	$\bar{y} = 57.6$	13.8	-7.0	± 8.4	n.s.
2.0	$\bar{y} = 39.8$	33.1	10.8	± 12.7	n.s.

Tab. 5b: Statistische Auswertung Bestärkungsschema DRH 4/2

Behandl. gruppe	Mittel- werte	Standard- abweichung	Diff. $\bar{x}-\bar{y}$	Annahme- bereich	Sig.
Ko	$\bar{x} = 56.2$	30.7			
0.05	$\bar{y} = 71.0$	6.9	14.5	± 19.8	n.s.
0.5	$\bar{y} = 66.6$	13.5	10.1	± 21.6	n.s.
2.0	$\bar{y} = 43.1$	37.1	13.4	± 29.6	n.s.

Tab. 5c: Statistische Auswertung Bestärkungsschema DRL 1/8

Behandl. gruppe	Mittel- werte	Standard- abweichung	Diff. $\bar{x}-\bar{y}$	Annahme- bereich	Sig.
Ko	$\bar{x} = 50.4$	10.2			
0.05	$\bar{y} = 49.9$	6.2	0.5	± 7.4	n.s.
0.5	$\bar{y} = 49.1$	7.1	1.3	± 5.8	n.s.
2.0	$\bar{y} = 56.4$	6.9	6.0	± 7.6	n.s.

Wie aus den Tabellen 5 a-c hervorgeht, liegen die Mittelwertdifferenzen $\bar{x}-\bar{y}$ bei allen Testgruppen und auch in allen drei Lernprogrammen innerhalb des Annahmebereichs. Es gilt deshalb die Alternativhypothese. Die Leistungsunterschiede der Behandlungsgruppen sind somit bei der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% statistisch nicht signifikant. Einzelne Leistungsunterschiede wären bei etwas größer gewählten Vertrauensintervallen durchaus signifikant (z.B. Behandlungsgruppe 0.05 DRH 2/1- Lernstufe bei $\alpha = 0.08$). Auch die Überprüfungen von Teilleistungen der Testgruppen, z.B. einzelne Tagesleistungen, erbrachten bei den gewählten statistischen Parametern ($\alpha = 0.05$) erwartungsgemäß keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

5. Diskussion

5.1 Gewichtsentwicklung der Tiere

Bei den durchgeführten Verhaltensuntersuchungen sollten externe Einflüsse sowie Unterschiede im Tiermaterial weitgehend eingeschränkt werden. Um mit einem nahezu homogenen Tiermaterial arbeiten zu können, wurden nur gleichaltrige, männliche Tiere aus Inzuchtstämmen als Testtiere verwendet. Aus einer Grundgesamtheit von 50 Wistar-Ratten wurden 40 Tiere mit einem mittleren Gewicht ausgewählt. Während der Behandlung der Tiere mit den verschiedenen konzentrierten Hg-Lösungen war die Gewichtsentwicklung eines der wichtigsten Überwachungsmerkmale.

Wie aus Abb. 1 entnommen werden kann, waren die Gewichtszunahmen während der 10-tägigen Behandlungsdauer stark dosisabhängig. Rückgang der Nahrungsaufnahme und damit Gewichtsverluste sind erste Anzeichen bei Intoxikationen mit Quecksilberverbindungen. Berthoud et al., (1976) stellten bei 50 Tage alten Mäusen, die dann 2 Monate lang täglich 4,0 mg MMC / kg KG p.o. erhalten sollten, sofort nach Behandlungsbeginn eine Reduktion der Futteraufnahme fest. Ab dem 7. Behandlungstag wurde auch eine Gewichtsabnahme beobachtet. Bei den Tieren, die mit 1,0 mg MMC / kg KG behandelt wurden, konnten die Autoren bis zum 22. Behandlungstag keine Unterschiede in Nahrungsaufnahme und Gewichtsentwicklung gegenüber den Kontrolltieren feststellen. Da größere und schwerere Tiere eine höhere Hebeldruckindikatortätigkeit erwarten lassen und damit besonders in den DRH-Programmen bessere Ergebnisse erzielen könnten, sollten die Tiere der einzelnen Dosisgruppen auch in ihrer Gewichtsentwicklung keine allzu großen Unterschiede aufweisen. Obwohl starke individuelle Empfindlichkeitsunterschiede gegenüber Hg-Verbindungen bei Tieren vorhanden sind, mußte keines der Versuchstiere während der 10-tägigen Intoxika-

tion noch bis zu Verhaltenstestbeginn ausgesondert werden.

Auch in der Gewichtsentwicklung während der gesamten Versuchsdauer waren die Testgruppen weitgehend ausgeglichen, wie aus Abb. 13 entnommen werden kann, wobei allerdings die Unterschiede der absoluten Körpergewichte auch während der 5-monatigen Versuchsdauer bestehen blieben. Die Gewichtsunterschiede entsprachen durchaus der natürlichen Streuung und somit konnten keinerlei behandlungsbedingten Abweichungen festgestellt werden.

Es kann daher angenommen werden, daß die Gewichte der Tiere keinen Einfluß auf die Lernleistungen in den verschiedenen Verhaltenstests hatten. Auch die geringeren Gewichtszunahmen der Substanzgruppen während der Behandlung waren bei Verhaltenstestbeginn nahezu wieder ausgeglichen. Äußerlich waren an den Tieren keine Veränderungen festzustellen. Man konnte deshalb davon ausgehen, daß die Tiere unter weitgehend identischen Bedingungen die Verhaltenstests in den Skinnerboxen begonnen haben.

5.2 Beurteilung der Ergebnisse der Verhaltenstests

DRH- Lernleistung

Die Lernleistungen der Tiergruppen in den verschiedenen Teststufen sollen nun näher betrachtet werden. Dabei sollen Einflüsse und Abhängigkeiten und vor allem Besonderheiten der Leistungszusammensetzung in den einzelnen Dosisgruppen und auch gruppenspezifische Besonderheiten erläutert werden. Ein Vergleich der unterschiedlichen Erfolgsquoten dürfte streng genommen nur in ein und demselben Testprogrammschritt vorgenommen werden. Es sollen deshalb zunächst die Lernleistungen der Tiere während der beiden aufeinander aufbauenden DRH- Teststufen diskutiert werden.

Kombinierte Lernprogramme, wie die beiden DRH 2/1- und DRH 4/2- Bestärkungsprogramme, scheinen zum Nachweis von Verhaltensänderungen - ausgelöst durch Umweltschadstoffe - besonders geeignet, da in demselben Lernprogramm eine numerische Steigerung im Schwierigkeitsgrad vorgenommen werden kann. Bei erwachsenen Tieren, denen im Gegensatz zu jungen Tieren schwierigere Testanforderungen gestellt werden können, werden Leistungsunterschiede oft erst bei gestiegenen Testanforderungen aufgedeckt (Bornhausen et al., 1980).

In den beiden DRH- Tests war neben den beobachteten Leistungsunterschieden am Ende der Testung besonders auffällig, daß die Kontrollgruppe eine schlechtere DRH- Leistung erreichte als die Behandlungsgruppen. Diese Differenz war hauptsächlich durch eine "Null" Leistung von Tier Nr. 11 bedingt, das die Indikatorfähigkeit des Hebeldrückens während der beiden DRHSitzungen nicht erlernt hatte. Gegen eine Nichtberücksichtigung dieses individuellen Versagens bei der Leistungsberechnung sprach die befriedigende Leistung dieses Tieres in dem anschließenden DRL-Testprogramm.

Mit der Steigerung des Schwierigkeitsgrades der Verhaltens-tests im Programmschritt DRH 4/2 wurden die gruppenspezifischen Unterschiede deutlicher. Wie aus dem Anstieg der Kurven (Abb. 5) entnommen werden kann, konnte insbesondere die höchste Dosisgruppe ihre Erfolgsquote während der Test-sitzung nur relativ langsam verbessern. Diese Tiere benötigten also im Mittel eine längere Zeit als die anderen Gruppen, um eine bestimmte Erfolgsquote zu erreichen. Darin dokumentiert sich eine Verhaltensbeeinträchtigung gerade dieser Gruppe, denn durch Messen der Zeit bis zum Eintritt einer bestimmten Verhaltenshäufigkeit können Defizite in der Lernleistung offengelegt werden.

DRL - Lernleistung

Bei einer vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse der vier Testgruppen im DRL-Programm ist die Ausgeglichenheit der erbrachten Leistungen offensichtlich. Besonders deutlich kommt dies durch den nahezu parallelen Verlauf der Lernleistungskurven in Abbildung 7 und auch in der Säulendiagrammdarstellung der einzelnen Tagesleistungen in Abbildung 8 zum Ausdruck. Auffallend ist auch die bereits zu Versuchsbeginn geringfügig höhere Erfolgsquote der höchsten Dosisgruppe gegenüber den anderen drei Testgruppen. Dies wird aber verständlich, wenn man die Leistungen dieser Gruppe in den vorausgegangenen DRH-Teststufen betrachtet. Da diese Dosisgruppe hier deutlich schlechtere Erfolgsquoten aufwies, kann gefolgert werden, daß sie die schnelle Aufeinanderfolge von Hebeldrücken weniger gut erlernte. Da nun in der neuen DRL-Testsituation aber lang-sames, abwartendes Hebeldrücken für gute Erfolgsquoten von Vorteil war, findet die bessere Leistung der höchsten Dosisgruppe in diesem Test eine plausible Deutung.

Mit dem instrumentellen Konditionierungsverfahren DRL ließen sich somit keine eindeutigen behandlungsbedingten Verhaltensdefizite bei den Tieren nachweisen. Worin die Ursachen hierfür liegen, kann auch ein Blick auf die Gewichtsentwicklung der Testgruppen während der DRL 1/8- Testsitzen verdeutlichen. Wie aus Abb. 4 c entnommen werden kann, lagen hier nur unbedeutende Gruppenunterschiede vor. Es muß deshalb angenommen werden, daß es den Tieren keine Schwierigkeiten bereitete, genügend Futterbelohnungen zu erhalten, um ihren Hunger zu stillen und damit ihr Körpergewicht konstant zu halten. Somit war für die Tiere offensichtlich keine ausreichende Motivation mehr vorhanden, durch weiteres Hebeldrücken ihre Erfolgsquote zu steigern. Der erwartete Anstieg der Erfolgsquoten während der gesamten Testdauer war bei allen Gruppen gleich stark ausgeprägt. Die erzielten Resultate lassen somit den Schluß zu, daß die Lernanforderung dieses Tests für die Tiere nicht schwierig genug war und auch aus technischen Gründen nicht gesteigert werden konnte, um bei den ausgewählten Dosisbereichen Verhaltensdefizite offenzulegen. In künftigen Versuchen sollten deshalb die Versuchszeiten abgekürzt, die DRL- Intervalle von 8 auf 16 oder 32 Sekunden erhöht und somit die Testanforderungen - ähnlich den DRH- Konditionierungsprogrammen sukzessive erhöht werden.

Eine Wertung der gefundenen Verhaltensänderungen muß natürlich im Vergleich zu den in der Literatur dargestellten Ergebnissen vorgenommen werden. Dabei ergeben sich allerdings Schwierigkeiten, da adäquate Verhaltensuntersuchungen nur in geringer Zahl vorliegen. Am ehesten können die von Müsch (1980) durchgeführten Versuche mit den hier erfolgten Verhaltensuntersuchungen verglichen werden. Müsch konnte mit dem instrumentellen Konditionierungsverfahren DRH bei vier Monate alten Ratten, die oral 4×0.05 mg MMC/kg KG kurz vor der Testung erhalten hatten, keine Verhaltensänderungen feststellen. Diese Befunde konnten in unseren Untersuchun-

gen bestätigt werden, wobei allerdings hier die Dosis $10 \times 0.05 \text{ mg MMC/kg KG}$ betrug. Auch Post et al. (1973) fanden in einfacheren Verhaltenstests, wie dem "Open Field", bei zwei Monate alten Ratten, die einmal p. o. eine Gesamtdosis von 25 mg MMC/kg KG verabreicht erhielten, noch keine Unterschiede zu den Kontrolltieren. Im T-Labyrinth jedoch zeigten diese Tiere signifikante Leistungsdefizite. Die Ergebnisse dieser Autoren stimmen weitgehend mit den hier gefundenen Resultaten überein, nämlich, daß durch anspruchsvollere Testmethoden Verhaltensdefizite gerade bei erwachsenen Tieren aufgedeckt werden können, die sich in einfacheren Verhaltenstests noch nicht manifestieren.

Ähnliche Ergebnisse ergaben auch die Versuche von Hughes et al. (1975), die junge Ratten und erwachsene Tiere mit jeweils äquivalenten Dosen von etwa $0.2 \text{ mg MMC/kg KG i.p.}$ behandelten. Bei den Jungtieren traten im sogenannten "Avoidance / Escape" Test (Vermeidungs- / Fluchtreaktion) bereits Verhaltensdefizite im Gegensatz zu den adulten Tieren auf. Durch die angeführten Beispiele wird deutlich, welche Vorteile bei verhaltenstoxikologischen Untersuchungen gerade solche Tests wie die beiden DRH- Tests bieten, bei denen die Möglichkeit einer graduellen Steigerung im Schwierigkeitsgrad gegeben ist.

Neben den spezifischen Testanforderungen - Erlernen der Anzahl der geforderten Hebeldrücke pro Zeiteinheit bzw. Einhaltung der geforderten Intervalle für eine Belohnung - hatten die Tiere die Zusatzaufgabe, zwischen den Hell- und Dunkelperioden zu unterscheiden, da sie nur während der Hellperioden eine Futterbelohnung erhalten konnten. Wie aus den Abbildungen 10a - 10c und 11 entnommen werden kann, traten Unterschiede in den Hell- Dunkel- Diskriminationsleistungen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen nur zu Beginn der jeweiligen Testsitzungen auf. Mit fortschreiten-

der Testdauer erfüllten alle Testgruppen diese relativ einfache Lernanforderung in zunehmenden Maße, sodaß mit diesem Test keine behandlungsbedingten Unterschiede aufgedeckt werden konnten. Auch wenn die Ergebnisse dieses Tests in ihrer Aussagekraft beschränkt waren, war aus versuchstechnischen und speziell motivationsspezifischen Gründen das Aufteilen der Testzeiten in Hell- und Dunkelperioden als notwendig anzusehen.

5.3 Aktivität und Lernleistung

Beim Vergleich der Leistungsdaten während der einzelnen Programme mit den dabei gezeigten Hebeldruckaktivitäten scheint eine weitgehende Übereinstimmung gegeben zu sein. Mit einer Ausnahme (DRH 2/1; 3. Tag; Dosisgruppe C) entsprachen die Erfolgsquoten in den einzelnen Lernprogrammen linear den von den verschiedenen Gruppen hierbei gezeigten Hebeldruckraten.

Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß das Maß für die Aktivität (Hebeldrücke während der Hellphasen, HDH) in direktem Zusammenhang mit den jeweiligen Lernprogrammen zu sehen ist. In wie weit die Behandlung der Tiere mit Methylquecksilberchlorid einen Einfluß auf die Gesamtaktivität der Tiere ausübte, läßt sich mit dieser Art der Aktivitätsmessung innerhalb der Lerntests nicht beantworten, da nur ein Teilaspekt der Gesamtaktivität - nämlich die Indikator-tätigkeit des Hebeldrückens - Eingang in die Darstellung erhält. Dennoch ist diese spezielle Aktivität beim Vergleich z.B. der circadianen Aktivität der einzelnen Gruppen als Zusatzinformation nützlich. Wie aus Abb. 12 entnommen werden kann, wiesen alle Testgruppen den gleichen tageszeitlichen Aktivitätsrhythmus auf. Eine behandlungsbedingt Beeinträchtigung des Biorhythmus der Tiere konnte somit nicht festgestellt werden.

In diesem Zusammenhang muß auch die Frage des gegenseitigen Einflusses des üblichen Hell- Dunkel- Rhythmus (21.00 - 07.00) und dem während der Verhaltenstestung gegebenen Rhythmus zwischen 30 min Hell- und 60 min Dunkelphasen offen bleiben.

Die Angaben in der Literatur über einen Einfluß von Methylquecksilber auf die generelle Motilität der Versuchstiere sind in soweit einheitlich, als diese Substanz schon in subtoxischen Dosen zu einer Reduktion der allgemeinen motorischen Aktivität führt. (Spyker et al., 1972; Salvaterra et al., 1973). Diese Beobachtung steht auch im Gegensatz zu der sicherlich unbegründeten Annahme, daß MMC schon in niederen Dosen zu einer Steigerung der Aktivität führen könnte, wie dies bei niederen Bleidosen registriert wurde (Winnecke et al., 1977).

Um somit die Frage beantworten zu können, ob die Aktivität der Tiere durch Methylquecksilber beeinflusst wird und insbesondere, welche Abhängigkeiten zwischen Aktivität und Lernleistung bestehen, müßten umfangreiche Messungen an ausreichend großen Tiergruppen vorgenommen werden. Dabei sollte aber die gesamte motorische Aktivität der Tiere Berücksichtigung finden.

5.4 Beurteilung der Ergebnisse der histologischen Zusatzuntersuchungen

Bei den histologischen Kontrolluntersuchungen konnten erwartungsgemäß mit den im Kapitel 4.9 beschriebenen Kriterien keinerlei behandlungsbedingte Unterschiede zwischen den Kontrollen und den drei Dosisgruppen festgestellt werden.

Auch Post et al. (1973) konnten bei zwei Monate alten Ratten, die sogar 25.0 mg MMC/kg KG p. o. erhalten hatten, zwar Verhaltensdefizite im T-Labyrinth, jedoch keine histopathologischen Veränderungen feststellen. Die deutlich ausgeprägten Lernleistungsdefizite einzelner Tiere sprechen - trotz des fehlenden signifikanten Gruppenunterschieds - für die Richtigkeit der Annahme, daß die Testung konditionierter Reaktionen subtile Verhaltensänderungen als Folge einer Quecksilberintoxikation bereits erfassen kann, lange bevor strukturelle Gewebsdefekte mikroskopisch nachweisbar werden.

Für diese Annahmen finden sich auch in der Literatur zahlreiche Beispiele, wie bereits beschrieben (Post et al., 1973; Müsch et al., 1980; Bornhausen et al., 1980). Morphologische Veränderungen scheinen bei erwachsenen Ratten erst nach höheren als den hier angewandten MMC-Vergiftungsdosen aufzutreten.

5.5 Bewertung der statistischen Überprüfung der Ergebnisse

Da die gefundenen Lernleistungsunterschiede auf den Signifikanzniveaus von 95 bzw 99 % nicht statistisch abgesichert werden konnten, sollen nun die Ursachen hierfür erläutert werden. Die Gründe können am besten durch die Analyse der einzelnen Gruppenleistungen aufgedeckt werden. Bei früher im Institut durchgeführten ähnlichen Untersuchungen ergaben sich oft statistische Probleme, die aus nicht ausreichendem Datenmaterial pro Einzeltier resultierten. Damals wurden nur einstündige Testsitzungen pro Tag durchgeführt. Deshalb wurde durch Ausdehnung der Testzeiten auf 3 x 24 Stunden versucht, umfangreicheres Datenmaterial zu erhalten, um besser fundierte und abgesicherte Aussagen treffen zu können. Für die individuellen Leistungsberechnungen der Tiere lagen dadurch genügend Daten vor. Das Grundproblem aber, nämlich die Streuung der individuellen Erfolgsquoten innerhalb einer Behandlungsgruppe, blieb durch diese Maßnahme unberührt. Wie aus der Standardabweichung in den Tabellen 5a - c entnommen werden kann, waren die individuellen Leistungsunterschiede in der Kontroll- und der höchsten Dosisgruppe am höchsten. Bei Betrachtung der Einzelleistungen dieser Gruppen fällt auf, daß nur gute und schlechte Leistungen vorkamen; durchschnittliche Werte fehlten. In beiden Gruppen waren Tiere vertreten, die keinerlei Leistung zeigten - also eine "Null"- Leistung aufwiesen.

Bei Überprüfen der Mittelwertdifferenzen wird bei statistischen Tests von normalverteilten Grundgesamtheiten ausgegangen. In den Testgruppen, die aus jeweils zehn Tieren bestanden, lagen die Erfolgsquoten zwischen 0 und 85 %, wobei ein Großteil der Gruppenmitglieder in ihren Leistungen recht eng beieinander lag. Ein einzelnes Tier mit einer "Null"- Leistung hatte somit einen quasi überproportionalen Einfluß auf die errechneten Mittelwerte, zumal die Gruppen nur aus zehn Mitgliedern bestanden. Daraus wird ersicht-

lich, daß die aus solchen Grunddaten errechneten Mittelwerte eine große Varianz aufweisen müssen. Die in unseren Untersuchungen festgestellten Unterschiede im Leistungsniveau der verschiedenen Gruppen waren somit statistisch unbefriedigend.

Um aber in zukünftigen Vorhaben befriedigendere Ergebnisse zu erreichen, böten sich verschiedene Möglichkeiten an, wie zum Beispiel eine Vergrößerung der Besetzung der Testgruppen, damit Ausreißer nicht so stark ins Gewicht fallen oder auch eine homogenere Besetzung der Testgruppen.

Diese Ziele könnten durch Vorversuche und Elimination von Ausreißern oder auch durch genetisch einheitlichere Gruppenmitglieder - wie zum Beispiel Verwendung von Tieren aus wenigen Würfen - erreicht werden. Vorversuche wären vorteilhaft, da Tiere, die während der Testsitzungen ausfallen, sei es durch technische Defekte oder aus sonstigen Gründen, nicht mehr durch Ersatztiere vertreten werden können, da der Trainingseffekt der vorausgegangenen Testsitzungen nicht mehr aufgeholt werden kann.

Bei einer abschließenden zusammenfassenden Wertung der gefundenen Ergebnisse bleibt folgendes festzuhalten: Eine im Vergleich zu den Kontrollen beeinträchtigte Verhaltensleistung erwachsener Ratten nach Methylquecksilberintoxikation deutete sich mit den durchgeführten Testverfahren erst bei der 10 x mit 2.0 mg MMC/kg KG behandelten Gruppe an. Da die beobachteten Leistungsdefizite jedoch statistisch nicht signifikant waren, wären weitere Untersuchungen in diesem Dosisbereich angezeigt, um eventuell mit größeren Tierzahlen und einem homogeneren Tiermaterial eindeutige Aussagen treffen zu können. Da für den Menschen das Risiko einer akuten Intoxikation mit Methylquecksilber im Gegensatz zur chronischen Exposition relativ gering ist, wären für eine Risikoabschätzung dieser Schwermetallverbindung Langzeitversuche mit niedrigen Dosen erforderlich.

6. Zusammenfassung

Um mögliche neurotoxische Einflüsse von Umweltchemikalien und speziell von Schwermetallen wie Quecksilber auf erwachsene männliche Wistar-Ratten zu erfassen, wurden in einer "blinden" Untersuchung drei Gruppen von jeweils zehn Tieren mit der Modellschubstanz Methylquecksilberchlorid (MMC) an zehn aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Die verabreichten Gesamtdosen betrugen 20 mg, 5 mg oder 0.5 mg MMC/kg KG. Eine weitere Gruppe, die entsprechend 10 x 1 ml physiologische Kochsalzlösung per Schlundsonde erhalten hatte, diente als Kontrolle.

Als Testapparatur diente eine Baueinheit von zehn Skinner-Boxen, die von einem Rechner gesteuert wurde und damit eine automatische Datenregistrierung, statistische Auswertung und Dokumentation der anfallenden Daten und Ergebnisse ermöglichte.

Zur Testung der instrumentellen Lernfähigkeit der mit umweltrelevanten Dosen dieser organischen Quecksilberverbindung belasteten Tiere wurden zwei verschiedene Bestärkungsverfahren aus dem Bereich der operanten Konditionierung ausgewählt. Folgende Lernprogramme und Abstufungen kamen dabei sequentiell zur Anwendung:

1. "Differential Reinforcement of High-Rate" (DRH 2/1)
" " " " " " " " (DRH 4/2)
2. "Differential Reinforcement of Low-Rate " (DRL 1/8)

Neben diesen Verhaltensuntersuchungen wurden stichprobenweise auch histologische Untersuchungen vorgenommen und insbesondere Gehirnschnitte licht- und rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

Die Verhaltensuntersuchungen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Die mit der höchsten Quecksilberdosis behandelte Versuchsgruppe (10 x 2.0 mg MMC/ kg KG) zeigte in dem zeitlichen Verlauf der beiden DRH- Tests eine deutlich geringere - wenn auch statistisch nicht signifikante - Erfolgsquote bzw. schlechtere Lernleistung als die übrigen Testgruppen.

2. In dem DRL-Lernprogramm erreichten alle Gruppen schließlich nahezu identische Lernleistungen, wobei die höchste Dosisgruppe sogar einen geringfügig besseren Lernerfolg aufwies als die übrigen Testgruppen. Auch dieses Ergebnis konnte statistisch nicht gesichert werden.

Die zur Kontrolle an Stichproben durchgeführten histologischen Untersuchungen erbrachten keine quantifizierbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und den Kontrolltieren.

Da die festgestellten Lernleistungsunterschiede am Ende der Testung und in ihrem zeitlichen Verlauf statistisch nicht abgesichert werden konnten, sollten weitere Untersuchungen mit größeren Tierzahlen, homogenerem Ausgangsmaterial und differenzierteren Lernprogrammen, oder auch weiteren Dosisabstufungen, vorgenommen werden, um weitere Daten für die Risikoabschätzung einer subakuten Vergiftung des Menschen durch eine minimale Umweltverseuchung mit Quecksilber zu gewinnen.

Summary

Behavioral performance testing of rats by instrumental conditioning after environmental-doses-methylmercury-intoxication

To assess the neurotoxic effects of methylmercury chloride (MMC) upon adult male Wistar rats quantitatively, 3 groups of 10 animals were exposed to a total dose of either 20 mg, 5 mg, or 0.5 mg MMC/kg body weight. These doses were subdivided into 10m equal parts which were administered by stomach tube on 10 consecutive days. A control group received 10 x 1,0 ml saline. All animals were coded. Eight days after the end of MMC-treatment, the animal groups were tested for operant behavior deficiencies in a battery of 10 test chambers (Skinner-Boxes), which were simultanerously run and controlled by a micro-computer.

Instrumental performance patterns of each group were obtained in a sequence of food reinforced lever pressing schedules (Differential Reinforcement of High resp. Low Rate). Each test session lasted 3 x 24 hours. The learning requirements of the 3 consecutive conditioning paradigms were:

1. "Differential Reinforcement of High-Rate" (DRH 2/1)
" " " " " " " " (DRH 4/2)
2. "Differential Reinforcement of Low Rate" (DRL 1/8)

Samples of each group were examined for structural abnormalities by histo-pathological methods and scalar-electron-microscopy especially in the brain but revealed no alterations with respect to the controls.

Consistant behavioral performance deficits were observed in the rat group which was treated with 10 x 2.0 mg MMC/kg

in the two DRH- tests. The DRL- test revealed almost identical final results in all groups. Here, the group with the highest MMC- dose seemed to perform best.

Although the group differences lack statistical significance the analysis of individual performance and its time course during the test session duration indicate a risk of MMC- induced changes of learning ability even in adult rats which should be ascertained by further experiments using larger animal groups, appropriate criteria for group homogeneity, and more refined performance tests.

7. Literaturverzeichnis

Angermeier W.F.:

Kontrolle des Verhaltens.

Das Lernen am Erfolg.

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1976)

Bakir F. , S. F. Damluji, L. Amin-Zaki, M. Murtadha,
A. Khalidi, N. Y. Al-Rawi, S. Tikriti, I. Dhahir,
T. W. Clarkson, J. C. Smith, R. A. Doherty:

Methylmercury poisoning in Iraq.

Science 181, 230 - 241 (1973).

Berglund F., M. Berlin:

Human risk evaluation for various populations in Sweden due
to methylmercury in fish.

In: Chemical Fallout, ed.: M. W. Miller, G. G. Berg, 423

- 432, Springfield, (1969).

Berthoud H. R., R. H. Garman, B. Weiss:

Food intake, body weight, and brain histopathology in mice
following chronic methylmercury treatment.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 36, 19 - 30 (1976).

Bornhausen, M., H. R. Müsch, H. Greim:

Operant behavior performance changes in rats after prenatal
methylmercury exposure.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 56, 305 -310 (1980).

Bornhausen, M., A. Burgmeier, R. Matthes, I. Poller,
B. Semder:

Effects of prenatal treatment with ionizing radiation
and/or heavy metal compounds on the conditioned behavior of
rats.

In: Developmental Effects of Prenatal Irradiation,

ed. by H. Kriegel, W. Schmahl, G. Kistner, F. E. Stieve,

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 309 - 311 (1982).

Bornhausen, M.:

Verändertes Lernverhalten bei Ratten nach pränataler Exposition mit Schwermetallverbindungen.

Forschungsbericht im Auftrag des Umweltbundesamtes (UBA), Nr. 10606013/01 (1983).

Buelcke-Sam J., C. A. Kimmel:

Development and Standardization of Screening Methods for Behavioral Teratology.

Teratol. 20, 17-30 (1979).

Dürr W., H. Mayer:

Wahrscheinlichkeitsrechnung und Schließende Statistik.

Carl Hanser Verlag, München-Wien, 160-166 (1981).

Evans H. L., V. G. Laties, B. Weiss:

Behavioral effects of mercury and methylmercury.

Fed. Proc. 34, 1858 - 1867 (1975).

Ferster C. B., B. F. Skinner:

Schedules of Reinforcements.

Appleton- Century- Crofts, Inc., New York (1957).

Hagemann E., G. Schmidt:

Ratte und Maus, Versuchstiere in der Forschung.

Walter de Gruyter & Co., Berlin (1960).

Heinzmann U.:

Plexus chorioideus und seine ultrastrukturellen Veränderungen nach Röntgenexposition in utero.

In: Developmental effects of prenatal irradiation.

ed. by H. Kriegel, W. Schmahl, G. Kistner, F. E. Stieve

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 185-192 (1982).

Henschler D.:

Wichtige Gifte und Vergiftungen.

In: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
3. Aufl., Hrsg.: W. Forth, D. Henschler, W. Rummel,
Bibliographisches Institut Mannheim - Wien - Zürich, 572 -
642 (1980).

Hughes R., R. Belser, C. W. Brett:

Behavioral Impairment produced by exposure to subclinical
amounts of methylmercury chloride.

Environm. Res. 10, 54 - 58 (1975).

Jung S.:

Grundlage für die Zucht und Haltung der wichtigsten Ver-
suchstiere.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1962).

Köhler D., M. Madry, H. Heinecke:

Einführung in die Versuchstierkunde Bd. II, Angewandte
Versuchstierkunde.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 155 - 169 (1978).

Koronowski P.:

Nebenwirkungen von Quecksilberverbindungen auf Mensch und
Tier.

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-
und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem (Nov. 1973).

Kreuzer W., W. Hollwich:

Zum Quecksilbergehalt in Süßwasserfischen aus süddeutschen
Gewässern und seine lebensmittelhygienische Bewertung.

In: Fisch und Umwelt, Hrsg.: H. H. Reichenbach-Klinke,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 13 - 29 (1976).

Kröncke A.:

Keine Intoxikationen durch Amalgam-Zahnfüllungen.

Münch. med. Wschr. 123, 909 - 911 (1981).

Kurland L. T.:

An appraisal of the epidemiology and toxicology of alkylmercury compounds.

In: Mercury, mercurials and mercaptans

Ed.: M. W. Miller, Th. W. Clarkson, C. C. Thomas

Publisher, Springfield Illinois, 23 - 55 (1971).

Lattes V. G., P. B. Dews, D. E. Mc Millan, St. E. Norton:
Behavioral toxicity tests.

In: Principles and procedures for evaluation of the
toxicity of household substances.

Nat. Acad. of Sci., Washington, 111 - 118 (1977).

Matthes R., M. Bornhausen, K. P. Maierhofer, H. Müsch:
Steuerung und Analyse von Verhaltenstests zur quantitativen
Erfassung von Entwicklungsschäden mit Hilfe der Mikro-
elektronik.

In: Developmental effects of prenatal irradiation.

Ed. Kriegel H., W. Schmahl, G. Kistner, F. E. Stieve,

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 313 - 315
(1982).

Müsch H. R., M. Bornhausen, H. Kriegel, H. Greim:
Methylmercury chloride induces learning deficits in pre-
natally treated rats.

Arch. Toxicol. 40, 103 - 108 (1978).

Müsch H.:

Änderungen des Lernverhaltens adulter Ratten als Folge
pränateller Applikation niedriger Dosen Methylquecksilber-
chlorids.

Dissertation der Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-
Universität München, (1980).

NCTR/FDA Studie (National Center of Toxicological Research/
Food and Drug Administration):

Interlaboratory comparison of standardized methods in a
behavioral teratology protocol.

Depart. of Health Education and Welfare, Jefferson (1980).

Nuorteva P.:

Methylquecksilber in den Nahrungsketten der Natur.

Naturwiss. Rundschau 24, 233 - 243 (1971).

Post E. M., G. Yang, J. A. King, V. L. Sanger:

Behavioral changes of young rats force-fed methylmercury
chloride.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 4, 1113 - 1116 (1973).

Rothstein A.:

Mercaptans, the biological targets for mercurials.

In: Mercury, mercurials and mercaptans.

Ed.: M. W. Miller, Th. W. Clarkson, C. C. Thomas

Publisher, Springfield Illinois, 69 - 95 (1971).

Salvaterra P., B. Lown, J. Morganti, E. J. Massaro:
Alteration in neurochemical and behavioral parameters in
the mouse induced by low doses of methylmercury.

Acta. Pharmacol. Toxicol. 33, 177 - 190 (1973).

Schilcher H.:

Rückstandsbelastung von Drogen und Drogenzubereitungen.

Deut. Apoth. Ztg. 125, 47 - 52 (1985).

Schuckmann F.:

Die Merkfähigkeit bleibt intakt - und Anderes auch.

Arbeitsmed. Sozialmed. Präventivmed. 16, 165 (1981).

Spycker J. M., S. B. Sparber, A. M. Goldberg:

Subtle consequences of methylmercury exposure: Behavioral

deviations in offspring of treated mothers.
Science 177, 621 - 623 (1972).

Takeuchi T.:

Pathology of Minamata disease.

In: Minamata Disease, Study Group of Kumamoto Univ.
ed.: S. Kutsuna, Kumamoto / Japan: Shuhan Press, 141 - 228
(1968).

Utzinger R.:

Quecksilber in der Umwelt.

Chem. Rundschau 33, 1 - 2 (1980).

Venugopal B., T. D. Luckey:

Metall toxicity in mammals chemical toxicity of metals
and metalloids.

Plenum Press, New York-London, 86 - 99 (1978).

Vorhees Ch. V., R. E. Butcher:

Behavioral teratogenicity.

Developm. Toxicol., ed.: K. Snell, Croom Helm London,
247 - 299, (1982).

Weigert P., J. Müller, H. Klein, K. P. Zufelde, J.
Hillebrand:

Arsen, Blei, Cadmium und Quecksilber in und auf
Lebensmitteln.

Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemi-
kalien des Bundes-Gesundheitsamtes ZEBS-Hefte 1, (1984).

Weiss B., V. G. Laties:

Assays for behavioral toxicity: A strategy for the
environmental protection agency.

Neurobehav. Toxicol. 1, Suppl., 213 - 215 (1979).

Winnecke G., A. Brockhaus, R. Baltissen:
Neurobehavioral and systemic effects of longterm blood
lead-elevation in rats.
Arch. Toxicol. 37, 247 - 263 (1977).

Zenick H.:
Behavioral and biochemical consequences in methylmercury
chloride toxicity.
Pharmacol. Biochem. Behav. 2, 709 - 713 (1974).

Verzeichnis der wichtigsten Abkürzungen

AAS	= Atomabsorptionsspektroskopie
ADI	= Acceptable daily intake
DRH	= Differential Reinforcement of High Rate
DRL	= Differential Reinforcement of Low Rate
FDA	= Food and Drug Administration
Hg	= Methylquecksilber
HDH	= Hebeldruck in der Hell- Phase
HDD	= Hebeldruck in der Dunkel- Phase
HWZ	= Biologische Halbwertszeit
i. p.	= Intra peritoneal
KG	= Körpergewicht
MeHgCl	= Methylquecksilberchlorid
MEZ	= Mitteleuropäische Zeit
MMC	= Methylmercury chloride
NCTR	= National Center for Toxicological Research
α	= Irrtumswahrscheinlichkeit
p. o.	= per oral
ppb	= Parts per billion
ppm	= Parts per million
Re	= Reinforcements
Std	= Stunden
WHO	= World Health Organisation
ZEBS	= Zentrale Erfassungs- und Bewertungsstelle für Umweltchemikalien des Bundes-Gesundheitsamtes
ZNS	= Zentrales Nervensystem

Herrn Prof. Dr. K. Tempel danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung der Dissertationsarbeit sowie für seine Betreuung und für das meiner Arbeit stets entgegengebrachte Interesse.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. rer. nat., Dr. med. U. Hagen, Leiter der Abteilung für Strahlenbiologie der GSF, Neuherberg, für seine Förderung der Arbeit und die eingeräumten Arbeitsmöglichkeiten.

Herrn Dr. med. M. Bornhausen, Abteilung für Strahlenbiologie der GSF, Neuherberg, möchte ich besonders herzlich danken für die Überlassung des Themas sowie seine geduldige Beratung und umfangreiche Unterstützung während der Versuchsdurchführung und der Zusammenstellung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch:

Herrn Dr. rer. nat. U. Heinzmann, Abteilung für Nuklearbiologie der GSF, Neuherberg, für die Anleitung beim Anfertigen und Auswerten der Gehirnpräparate mit dem Rasterelektronenmikroskop.

Herrn Dr. med. vet., Dr. med. habil. W. Schmahl, Abteilung für Nuklearbiologie der GSF, Neuherberg, für seine Bemühungen bei der Auswertung der histologischen Präparate.

Herrn Dr. med. P. Schramel, Physikalisch-Technische Abteilung des Instituts für Angewandte Physik, und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der Restmengenbestimmungen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank den Mitarbeitern der Abteilung für Strahlenbiologie der GSF, Neuherberg, Frl. M. Zengerle, Frau B. Semder für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und ihre geduldige Hilfsbereitschaft bei allen technischen Problemen.

Lebenslauf

Josef Schormüller

geboren am 16.03.1954 in Holheim, jetzt Nördlingen/Bayern

Vater: Michael Schormüller

Mutter: Anna Schormüller, geb. Leberle

1960 - 1965: Besuch der Volksschule in Kleinerdingen

1965 - 1974: Theodor-Heuss-Gymnasium in Nördlingen

Juni 1974 Abitur in Nördlingen

1974 - 1975: Wehrdienst

1976 - 1978: Studium der Volkswirtschaftslehre in Tübingen,
Vordiplom

1978 - 1981: Studium der Tiermedizin in Berlin

1981 - 1983: Studium der Tiermedizin in München

Januar 1984: Approbation als Tierarzt

Seit März 1984 Anfertigung der vorliegenden Arbeit.

